



**UNIVERSIDAD DE  
SANTIAGO DE COMPOSTELA**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología  
Instituto de Investigaciones y Análisis Alimentarios**

**DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE MICROEXTRACCIÓN EN  
FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES  
EMERGENTES EN MATRICES ACUOSAS**

**María Polo Piñeiro**

**Memoria para optar al grado de Doctora en Química**

**Santiago de Compostela, Junio de 2007**



**D. Alberto Cepeda Sáez**, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**Informa:**

Que Dña. **María Polo Piñeiro** ha realizado en este departamento, bajo la dirección de las Profesoras Titulares de Universidad Dña. María Llompart Vizoso y Dña. Carmen García Jares, el trabajo ***“Desarrollo de nuevos métodos de microextracción en fase sólida para la determinación de contaminantes orgánicos emergente en matrices acuosas”***, que presenta para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, a 18 Junio de 2007.

D. Alberto Cepeda Sáez



**Dña. María Llompart Vizoso y Dña. Carmen García Jares**, Profesoras Titulares de la Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**Autorizan:**

A la licenciada Dña. **María Polo Piñeiro**, la presentación de la memoria adjunta, titulada ***“Desarrollo de nuevos métodos de microextracción en fase sólida para la determinación de contaminantes orgánicos emergente en matrices acuosas”***, que ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química, para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que conste, firmamos la presente en Santiago de Compostela, a 18 Junio de 2007.

Dña. María Llompart Vizoso

Dña. Carmen García Jares



## AGRADECIMIENTOS

La realización de la Tesis Doctoral posiblemente sea una de esas etapas únicas e irrepetibles que pueda vivir una persona, enriqueciéndola en todos los sentidos y en muchos casos encaminando su futuro profesional. Para mí lo ha sido y ahora que he llegado al final, es inevitable que eche la vista atrás para comprobar cuantas personas e instituciones han sido las que de algún modo u otro han colaborado en este trabajo. Así, desde estas páginas me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a cada una de ellas.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directoras, María Llompарт y Carmen Jares, por el esfuerzo y la dedicación que les ha supuesto la supervisión de este trabajo. A ambas les agradezco sinceramente, no sólo el permitirme realizar esta Tesis bajo su dirección, sino también el darme su apoyo, compartir conmigo sus conocimientos y transmitirme su pasión por la investigación.

Quisiera agradecer al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, al Instituto de Investigaciones y Análisis Alimentarios (IIAA), y en especial a Rafael Cela, el permitirme formar parte de su grupo de investigación y ofrecerme todos los medios técnicos y materiales para la realización de este trabajo.

También agradezco la concesión de las becas que he disfrutado a lo largo de estos años a la Dirección Xeral de Investigación e Desenvolvemento de la Xunta de Galicia.

Al doctor Jacob de Boer, y en especial al doctor Pim Leonards, por su acogida y atención durante los tres meses que pasé en el *Institute for Fisheries Research* (RIVO, Holanda). Dank u zeer.

A todos mis compañeros del IIAA, tanto los que ya no están, como los que seguís dándole vida, por hacer que incluso los malos momentos fuesen tan divertidos. En especial a los que habéis trabajado codo con codo conmigo, por compartir vuestro esfuerzo y enseñarme que los objetivos alcanzados se disfrutan más si son compartidos.

Por supuesto, a Carmen, mi compañera de fatigas, aventuras, de risas y tristezas. Por preocuparte de mí más que yo misma. Puedes estar segura que aunque nuestros barcos sigan rumbos diferentes, estaré siempre a tu lado.

A mis tres mosqueteras, Fa, Noe y Laura, vivir con vosotras ha sido un verdadero placer. Sois más que mis amigas, sois mi familia. Y como no, a las niñas, Ana y Noe, ánimo que al final todo llega. Os quiero.

Por último desde lo más profundo de mi corazón quiero agradecer a mi familia y amigos todo el amor, apoyo y comprensión que me han brindado. A mis padres, muy especialmente, quiero agradecerles el haberme dado oportunidades que ellos no tuvieron, y el apoyarme siempre aún sin entenderme. A mi madre por sacar fuerzas en los momentos más duros para salir adelante y disfrutar conmigo estos momentos. A Dani, agradecerle su cariño y apoyo incondicional, sin el cual no habría sido capaz de terminar este trabajo.

A todos GRACIAS.

*María*



***A mis padres***

“La imaginación es más importante que el conocimiento”

“Si tu intención es describir la verdad, hazlo con sencillez y la elegancia déjasela al sastre”

Albert Einstein, 1899-1955



# DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EMERGENTES EN MATRICES ACUOSAS

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
<b><u>I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>II. INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>7</b>
<b><u>II.1. FRAGANCIAS SINTÉTICAS</u></b> .....	<b>9</b>
<b>II.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES</b> .....	<b>9</b>
<i>II.1.1.1. Definición, estructura y propiedades</i> .....	9
<i>II.1.1.2. Producción y usos</i> .....	11
<i>II.1.1.3. Distribución en el medioambiente</i> .....	13
<i>II.1.1.4. Consideraciones toxicológicas</i> .....	15
<b>II.1.2. ANÁLISIS EN MUESTRAS ACUOSAS AMBIENTALES</b> .....	<b>18</b>
<b>II.1.2.1. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA</b> .....	<b>18</b>
<i>II.1.2.1.1. Problemas de contaminación</i> .....	18
<i>II.1.2.1.2. Conservación y pretratamiento de las muestras</i> .....	18
<i>II.1.2.1.3. Extracción</i> .....	19
<i>II.1.2.1.3.1. Extracción líquido-líquido (LLE)</i> .....	19
<i>II.1.2.1.3.2. Extracción en fase sólida (SPE)</i> .....	19
<i>II.1.2.1.3.3. Microextracción en fase sólida (SPME)</i> .....	21
<b>II.1.2.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>23</b>

<b>II.2. PLASTIFICANTES: FTALATOS.....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....</b>	<b>27</b>
<i>II.2.1.1. Definición, estructura y propiedades.....</i>	<i>27</i>
<i>II.2.1.2. Producción y usos.....</i>	<i>29</i>
<i>II.2.1.3. Comportamiento en el medioambiente.....</i>	<i>30</i>
<i>II.2.1.4. Toxicología.....</i>	<i>33</i>
<i>II.2.1.5. Legislación.....</i>	<i>34</i>
<b>II.2.2. ANÁLISIS EN MUESTRAS DE AGUA.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2.2.1. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA.....</b>	<b>35</b>
<i>II.2.2.1.1. Blancos de agua.....</i>	<i>35</i>
<i>II.2.2.1.2. Conservación y pretratamiento de las muestras.....</i>	<i>35</i>
<i>II.2.2.1.3. Extracción.....</i>	<i>36</i>
<i>II.2.2.1.3.1. Extracción líquido-líquido (LLE).....</i>	<i>36</i>
<i>II.2.2.1.3.2. Extracción en fase sólida (SPE).....</i>	<i>37</i>
<i>II.2.2.1.3.3. Microextracción en fase sólida (SPME).....</i>	<i>38</i>
<b>II.2.2.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>II.2.2.3. MÉTODOS OFICIALES.....</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>42</b>
<b>II.3.COMPUUESTOS IGNÍFUGOS BROMADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>II.3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....</b>	<b>51</b>
<i>II.3.1.1. Definición, estructura y propiedades.....</i>	<i>51</i>
<i>II.3.1.1.1. PBDEs y PBBs.....</i>	<i>51</i>
<i>II.3.1.1.2. TBBPA y otros compuestos ignífugos fenólicos.....</i>	<i>55</i>
<i>II.3.1.2. Producción y usos.....</i>	<i>56</i>
<i>II.3.1.3. Distribución y presencia en el medioambiente.....</i>	<i>58</i>
<i>II.3.1.4. Exposición y toxicidad.....</i>	<i>60</i>
<i>II.3.1.5. Legislación aplicable.....</i>	<i>61</i>
<b>II.3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MUESTRAS AMBIENTALES.....</b>	<b>62</b>

II.3.1.5.1. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	63
II.3.1.5.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN.....	64
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>67</b>
<b><u>II.4. LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) COMO ETAPA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....</u></b>	<b><u>73</u></b>
<b>II.4.1. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA.....</b>	<b>74</b>
<i>II.4.1.1. Dispositivo de microextracción.....</i>	<i>74</i>
<i>II.4.1.2. Procedimiento.....</i>	<i>75</i>
<i>II.4.1.3. Modos de trabajo en SPME.....</i>	<i>76</i>
<b>II.4.2. FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA MICROEXTRACCIÓN.....</b>	<b>80</b>
<i>II.4.2.1. Aspectos termodinámicos.....</i>	<i>80</i>
<i>II.4.2.2. Aspectos cinéticos.....</i>	<i>83</i>
<b>II.4.3. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....</b>	<b>84</b>
<i>II.4.3.1. Recubrimiento polimérico.....</i>	<i>84</i>
<i>II.4.3.1.1. Recubrimientos homogéneos.....</i>	<i>85</i>
<i>II.4.3.1.2. Recubrimientos heterogéneos.....</i>	<i>86</i>
<i>II.4.3.2. Otros factores importantes.....</i>	<i>88</i>
<b>II.4.3. FACTORES QUE AFECTAN A LA ETAPA DE DESORCIÓN.....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>92</b>
<b><u>II.5. NUEVAS APLICACIONES DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....</u></b>	<b><u>95</u></b>
<b>II.5.1. DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE MICROEXTRACCIÓN (<math>K_{fs}</math>).....</b>	<b>96</b>
<i>II.5.1.1. Cálculo de la cantidad de analito extraída por la fibra (<math>n</math>).....</i>	<i>96</i>
<i>II.5.1.2. Influencia del recubrimiento polimérico.....</i>	<i>98</i>
<i>II.5.1.3. Efecto de la mezcla de analitos.....</i>	<i>99</i>
<b>II.5.2. CORRELACIÓN ENTRE <math>K_{fs}</math> y <math>K_{ow}</math>.....</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>102</b>

<b><u>II.6. QUIMIOMETRÍA APLICADA AL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....</u></b>	<b><u>105</u></b>
II.6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN.....	106
II.6.2. VALIDACIÓN.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	112
<b><u>III. PARTE EXPERIMENTAL GENERAL.....</u></b>	<b><u>115</u></b>
III.1. DISOLVENTES, REACTIVOS Y GASES.....	118
III.2. INSTRUMENTAL.....	118
III.2.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.....	118
III.2.2. SPME.....	118
III.2.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA.....	119
III.3. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE PATRONES Y MUESTRAS ACUOSAS.....	120
<b><u>IV. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN.....</u></b>	<b><u>121</u></b>
<b><u>IV.1. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS SINTÉTICAS EN MUESTRAS ACUOSAS.....</u></b>	<b><u>123</u></b>
IV.1.1. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS NITROGENADAS.....	123
IV.1.1.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	125
IV.1.1.1.1. Patrones y muestras.....	125
IV.1.1.1.2. Problemas de contaminación de las muestras.....	125
IV.1.1.1.3. Procedimiento de microextracción en fase sólida.....	126
IV.1.1.1.4. Condiciones instrumentales de medida.....	127
IV.1.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	129
IV.1.1.2.1. Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas.....	129
IV.1.1.2.2. Optimización del proceso de microextracción mediante diseño experimental.....	132
IV.1.1.2.3. Parámetros analíticos de calidad del método propuesto.....	140
IV.1.1.2.3.1 Condiciones experimentales.....	140

IV.1.1.2.3.2. Linealidad, Sensibilidad y Precisión.....	140
IV.1.1.2.4. Aplicación al análisis de muestras reales.....	142
<b>IV.1.2. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS POLÍCICLICAS.....</b>	<b>145</b>
<b>IV.1.2.1. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>147</b>
IV.1.2.1.1. Patrones y muestras.....	147
IV.1.2.1.2. Limpieza del material.....	148
IV.1.2.1.3. Procedimiento de microextracción en fase sólida.....	148
IV.1.2.1.4. Condiciones instrumentales de medida.....	150
<b>IV.1.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
IV.1.2.2.1. Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas.....	151
IV.1.2.2.2. Optimización del proceso de microextracción.....	156
IV.1.2.2.2.1. Diseño multifactorial categórico: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.....	156
IV.1.2.2.2.2. Evaluación de otros parámetros experimentales: Volumen de muestra, agitación, efecto salino y efecto memoria.....	162
IV.1.2.2.3. Parámetros analíticos de calidad del método propuesto.....	166
IV.1.2.2.3.1. Condiciones experimentales.....	166
IV.1.2.2.3.2. Linealidad.....	166
IV.1.2.2.3.3. Precisión.....	164
IV.1.2.2.3.4. Sensibilidad.....	168
IV.1.2.2.4. Aplicación a muestras reales.....	169
<b>IV.1.3. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE FRAGANCIAS NITROGENADAS Y POLICÍCLICAS.....</b>	<b>172</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>175</b>
<b><u>IV.2. DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE AGUA.....</u></b>	<b><u>177</u></b>
<b>IV.2.1. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>179</b>
IV.2.1.1. Patrones y muestras.....	179
IV.2.1.2. Precauciones para evitar la contaminación.....	180
IV.2.1.3. Procedimiento de microextracción en fase sólida.....	180
IV.2.1.4. Condiciones instrumentales de medida.....	182

<b>IV.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>183</b>
<b>IV.2.2.1. Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas.....</b>	<b>183</b>
<b>IV.2.2.2. Optimización del proceso de microextracción.....</b>	<b>184</b>
IV.2.2.2.1. Diseño multifactorial categórico: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.....	184
IV.2.2.2.2. Evaluación de otros parámetros experimentales: Agitación, efecto salino y tiempo de extracción.....	190
<b>IV.2.2.3. Parámetros analíticos de calidad del método propuesto.....</b>	<b>194</b>
IV.2.2.3.1. Condiciones experimentales.....	194
IV.2.2.3.2. Blanco de agua.....	194
IV.2.2.3.3. Linealidad.....	196
IV.2.2.3.4. Precisión.....	196
IV.2.2.3.5. Sensibilidad.....	197
<b>IV.2.2.4 Análisis de muestras reales.....</b>	<b>198</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>200</b>
<b><u>IV.3. DETERMINACIÓN DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs) EN MUESTRAS DE AGUA.....</u></b>	<b><u>203</u></b>
<b>IV.3.1. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>205</b>
IV.3.1.1. Patrones y muestras.....	205
IV.3.1.2. Procedimiento de microextracción en fase sólida.....	206
IV.3.1.3. Condiciones instrumentales de medida.....	207
<b>IV.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>209</b>
<b>IV.3.2.1. Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas.....</b>	<b>209</b>
<b>IV.3.2.2. Optimización del proceso de microextracción.....</b>	<b>211</b>
IV.3.2.2.1. DISEÑO FACTORIAL: Estudio de la influencia del recubrimiento polimérico, del modo de muestreo, de la agitación y del efecto salino.....	211
IV.3.2.2.2. Estudio del efecto de la temperatura de extracción y el volumen de las fases en la eficacia de la HSSPME de PBBs Y PBDEs.....	220
IV.3.2.2.3. Estudio del efecto memoria.....	223
IV.3.2.2.4. Estudio cinético de la HSSPME de PBBs Y PBDEs.....	224
<b>IV.3.2.3. Validación del método propuesto.....</b>	<b>225</b>



IV.3.2.3.1. Estudio de la linealidad, LODs y repetibilidad del método.....	226
IV.3.2.3.2. Estudio de la recuperación. Aplicación a muestras reales.....	227

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>230</b>
--------------------------	------------

#### **IV.4. ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE MICROEXTRACCIÓN ( $K_{fs}$ ) DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs).....**

<b>IV.4.1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>235</b>
--	------------

<b>IV.4.2. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>238</b>
--	------------

IV.4.2.1. Patrones y muestras.....	238
------------------------------------	-----

IV.4.2.2. Procedimiento de microextracción en fase sólida.....	238
--	-----

IV.4.2.3. Condiciones instrumentales de medida.....	240
---	-----

<b>IV.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>240</b>
--	------------

IV.4.3.1. Estudios preliminares de la SPME basados en la cuantificación mediante inyección líquida.....	240
---	-----

IV.4.3.2. Determinación de $K_{fs}$ mediante depleción.....	243
---	-----

IV.4.3.3. Correlación entre $\log K_{fs}$ - $\log K_{ow}$ .....	252
---	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>254</b>
--------------------------	------------

#### **IV.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS IGNIFUGOS FENÓLICOS EN MUESTRAS ACUOSAS AMBIENTALES.....**

<b>IV.5.1. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>259</b>
--	------------

IV.5.1.1. Patrones y muestras.....	259
------------------------------------	-----

IV.5.1.2. Procedimiento de microextracción en fase sólida.....	260
--	-----

IV.5.1.3. Condiciones instrumentales de medida.....	261
---	-----

<b>IV.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>262</b>
--	------------

IV.5.2.1. Derivatización in situ de los BFRs fenólicos.....	262
---	-----

IV.5.2.2. Optimización del proceso de microextracción.....	266
--	-----

IV.5.2.2.1. DISEÑO MULTI-FACTORIAL CATEGÓRICO: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.....	266
---	-----

IV.5.2.2.2. <i>EVALUACIÓN DE OTROS PARÁMETROS EXPERIMENTALES: Efecto salino, efecto del volumen de las fases, de la agitación y estudio cinético</i> .....	274
<b>IV.5.2.3. Características analíticas del método de acetilación-<i>in situ</i>-HSSPME propuesto</b> .....	<b>278</b>
IV.5.2.3.1. <i>Condiciones experimentales</i> .....	278
IV.5.2.3.2. <i>Linealidad, precisión y LODs</i> .....	278
IV.5.2.3.3. <i>Análisis de muestras reales</i> .....	281
 <b>IV.5.2.4. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS BFRs FENÓLICOS CON OTROS CONTAMINANTES FENÓLICOS</b> .....	 <b>282</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	 <b>287</b>
  <b><u>V. CONCLUSIONES</u></b>	  <b><u>289</u></b>
  <b><u>VI. ANEXOS</u></b>	  <b><u>299</u></b>
 <b><u>VI.1. ACRÓNIMOS</u></b> .....	 <b><u>301</u></b>
<b><u>VI.2. PUBLICACIONES</u></b> .....	<b><u>305</u></b>

## ÍNDICE DE TABLAS

### I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### II. INTRODUCCIÓN

#### II.1. FRAGANCIAS SINTÉTICAS..... 9

*Tabla II.1.1.1.1. Nombre común y químico, estructuras y propiedades físico-químicas de las fragancias considerados en este trabajo..... 10*

*Tabla II.1.1.2.1. Volúmenes de consumo (en toneladas/año) de fragancias sintéticas en Europa..... 12*

*Tabla II.1.1.3.1.1. Concentraciones (en pg/mL) de HHCB, AHTN, ADBI, MX y MK en muestras de agua (superficiales y efluentes de EDAR) de diferente procedencia..... 14*

*Tabla II.1.1.4.1. Toxicidad de las fragancias nitrogenadas en el medio acuático..... 16*

*Tabla II.1.1.4.2. Toxicidad de las fragancias policíclicas en el medio acuático..... 17*

#### II.2. PLASTIFICANTES: FTALATOS..... 27

*Tabla II.2.1.1.1. Nombre, acrónimo y grupos característicos de algunos ftalatos con aplicaciones industriales..... 28*

*Tabla II.2.1.1.2. Estructura y propiedades físico-químicas de los ftalatos objeto de estudio en este trabajo..... 29*

*Tabla II.2.1.3. Concentraciones (en ng/mL) de los seis ftalatos estudiados encontradas en distintas muestras de agua..... 30*

*Tabla II.2.2.1.1 Concentraciones (en µg/L) de los ftalatos detectados en muestras de agua de uso común en el laboratorio..... 35*

*Tabla II.2.2.3. Métodos propuestos por la EPA para el análisis de ftalatos en diferentes muestras de agua..... 41*

#### II.3.COMPUESTOS IGNÍFUGOS BROMADOS..... 51

*Tabla II.3.1.1.1. Nombre, nomenclatura según la IUPAC y estructura química de los PBDES y PBBs objeto de estudio..... 54*

*Tabla II.3.1.1.2. Nombre, presión de vapor (Po), solubilidad en agua (S), valor de la constante de Henry (H), coeficiente de partición octanol-agua (Kow) de los compuestos ignífugos fenólicos considerados..... 55*

<b>Tabla II.3.1.2.1.</b> Volúmenes de consumo estimados (en toneladas) de los principales compuestos ignífugos bromados (1999 y 2001).....	57
<b>Tabla II.3.1.3.1</b> Concentraciones representativas de las diferentes familias de BFRs en el medioambiente.....	59
<b>Tabla II.3.2.2.1.</b> Características de las diferentes columnas capilares de alta resolución utilizadas por Sjödin et al.....	65

#### **II.4. LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) COMO ETAPA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA..... 66**

<b>Tabla II.4.3.1.1.</b> Características de las fibras disponibles comercialmente por Supelco® .	85
--	----

### **III. PARTE EXPERIMENTAL GENERAL**

<b>Tabla III.2.2.1.</b> Características, condiciones de trabajo y acondicionamiento, de las fibras utilizadas en los estudios de aplicación de SPME.....	119
--	-----

### **IV. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN**

#### **IV.1. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS SINTÉTICAS EN MUESTRAS ACUOSAS..... 123**

<b>Tabla IV.1.1.1.4.1.</b> Condiciones de operación del GC-μECD utilizadas en la determinación de nitrofragancias en muestras acuosas.....	128
<b>Tabla IV.1.1.1.4.2.</b> Condiciones instrumentales del GC-MS utilizadas en la determinación de nitrofragancias en muestras acuosas.....	128
<b>Tabla IV.1.1.2.1.</b> Tiempos de retención, ión de cuantificación e iones de identificación para las cuatro fragancias nitrogenadas.....	130
<b>Tabla IV.1.1.2.2.1.</b> Valores de F y p para el análisis de varianza (ANOVA) y test de rango múltiple aplicados al estudio del recubrimiento de fibra.....	132
<b>Tabla IV.1.1.2.2.2.</b> Matriz de experiencias del diseño factorial fraccionado $3 \times 2^4 - 2$ .....	134
<b>Tabla IV.1.2.2.3.</b> Respuestas analíticas (cuentas de área) obtenidas para cada compuesto en las 12 experiencias de que consta el diseño.....	135
<b>Tabla IV.1.1.2.3.1</b> Condiciones experimentales del método de SPME propuesto para la determinación de nitrofragancias en muestras de agua.....	149
<b>Tabla IV.1.1.2.3.2.1</b> Estudio de la linealidad.....	140
<b>Tabla IV.1.1.2.3.2.2</b> Límites de detección del método.....	141
<b>Tabla IV.1.1.2.3.2.3</b> Precisión del método.....	141
<b>Tabla IV.1.1.2.3.5.1.</b> Recuperaciones (%) del método propuesto para las tres muestras estudiadas.....	142

<b>Tabla IV.1.1.2.3.5.2.</b> <i>Concentración (pg/mL) de las fragancias nitrogenadas encontradas en las muestras reales analizadas</i> .....	143
<b>Tabla IV.1.2.1.4.1.</b> <i>Condiciones de operación del GC-FID</i> .....	150
<b>Tabla IV.1.2.1.4.2.</b> <i>Condiciones instrumentales del GC-MS</i> .....	151
<b>Tabla IV.1.2.2.1.</b> <i>Tiempos de retención, ión de cuantificación e iones de identificación para las siete fragancias estudiadas</i> .....	153
<b>Tabla IV.1.2.2.2.1.1.</b> <i>Matriz de experiencias del diseño factorial completo 4*3*2</i> .....	157
<b>Tabla IV.1.2.2.2.1.2.</b> <i>Respuesta analítica (área de pico expresada en cuentas obtenida mediante GC-FID) de los siete compuestos estudiados</i> .....	157
<b>Tabla IV.1.2.2.2.1.3.</b> <i>Valores-p obtenidos en el análisis de varianza. En negrita aparecen los valores para los factores o interacciones estadísticamente significativos (<math>p &lt; 0.05</math>)</i> .....	159
<b>Tabla IV.1.2.2.2.2.</b> <i>Valor de F y valor de p para el ANOVA aplicado al estudio del efecto salino</i> .....	165
<b>Tabla IV.1.2.2.3.1.</b> <i>Condiciones experimentales del método de SPME propuesto para la determinación de seis fragancias policíclicas y una macrocíclica en muestras de agua</i> ..	166
<b>Tabla IV.1.2.2.3.2.</b> <i>Intervalo de concentraciones y coeficientes de correlación obtenidos en el estudio de la linealidad del método utilizando las fibras PDMS-DVB y CAR-PDMS</i> ....	167
<b>Tabla IV.1.2.2.3.3</b> <i>Precisiones del método propuesto con ambas fibras para cada una de las fragancias estudiadas</i> .....	168
<b>Tabla 1.2.2.3.4.</b> <i>Límites de detección obtenidos mediante HSSPME-GC-MS</i> .....	168
<b>Tabla IV.1.2.2.4.1.</b> <i>Concentración (en pg/mL) de las fragancias encontradas en las muestras de efluente e influente</i> .....	169
<b>Tabla IV.1.2.2.4.2</b> <i>Concentraciones de las fragancias detectadas en la muestra de intercomparación (pg/mL): <sup>a</sup>calibrado externo y <sup>b</sup>adición de estándar</i> .....	170
<b>Tabla IV.1.2.2.4.3</b> <i>Resultados del ejercicio de intercomparación (muestra de efluente)</i> ..	171
<b>Tabla IV.1.3.1.</b> <i>Concentración (pg/mL) de las fragancias detectadas en muestras reales empleando ambas fibras, CAR-PDMS y PDMS-DVB (*cuantificación por el método de adición)</i> .....	173
<b>IV.2. DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE AGUA</b> .....	<b>177</b>
<b>Tabla IV.2.1.4.</b> <i>Condiciones instrumentales del GC-MS</i> .....	182
<b>Tabla IV.2.2.1.</b> <i>Tiempos de retención, iones de cuantificación e iones de identificación para los seis ftalatos estudiados</i> .....	183
<b>Tabla IV.2.2.2.1.1</b> <i>Resultados del ANOVA para los seis ftalatos estudiados, mostrando la significación estadística de los factores principales y sus interacciones</i> .....	185

<b>Tabla IV.2.2.2.1.2.</b> Condiciones optimas para cada compuesto dadas por el diseño factorial categórico 5*3*2.....	189
<b>Tabla IV.2.2.3.1.</b> Condiciones experimentales del método de SPME propuesto para la determinación de ftalatos en muestras de agua.....	194
<b>Tabla IV.2.2.3.2.</b> Concentraciones en (pg/mL) de los ftalatos encontrados en las muestras de agua usadas como blancos en este estudio.....	195
<b>Tabla IV.2.2.3.2.</b> Intervalo de concentraciones y coeficientes de correlación obtenidos en el estudio de la linealidad del método.....	196
<b>Tabla IV.2.2.3.4</b> Precisión del método.....	196
<b>Tabla IV.2.2.3.5</b> Límites de detección del método.....	197
<b>Tabla IV.2.2.6.1</b> Concentración (en pg/mL) de los ftalatos encontrados en las muestras reales estudiadas, obtenidas por calibrado externo.....	199
 <b>IV.3. DETERMINACIÓN DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs) EN MUESTRAS DE AGUA.....</b>	<b>203</b>
 <b>Tabla IV.3.1.3.1.</b> Condiciones instrumentales empleadas en el análisis de PBDEs y PBBs .....	208
<b>Tabla IV.3.1.3.2.</b> Parámetros instrumentales específicos para cada compuesto del método de preparación de iones del método de MS-MS.....	208
<b>Tabla IV.3.2.2.1.1.</b> Matriz de experiencias del diseño factorial completo 2^4 generada por Statgraphics® Plus.....	214
<b>Tabla IV.3.2.2.1.2.</b> Condiciones óptimas para la extracción de PBDES y PBBs.....	220
<b>Tabla IV.3.2.3.1</b> Condiciones experimentales del método propuesto para la determinación de PBBs y PBDEs en muestras de agua.....	225
<b>Tabla IV.3.2.3.1.1.</b> Intervalos de concentración, coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y límites de detección (LODs) obtenidos en el estudio de la linealidad del método.....	226
<b>Tabla IV.3.2.3.1.2</b> Repetibilidad del método propuesto.....	227
<b>Tabla IV.3.2.3.2.1</b> Recuperación (expresada en %) de los PBDEs y PBBs para las tres muestras reales estudiadas.....	228
 <b>IV.4. ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE MICROEXTRACCIÓN (Kfs) DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs).....</b>	<b>233</b>
 <b>Tabla IV.4.3.1.1.</b> Sobrestimación de las eficacias de microextracción mediante calibrado por inyección directa.....	241

<b>Tabla V.4.3.2.2</b> Pendientes, coeficientes de regresión, eficacias de extracción y logaritmo de los valores de $K_{fs}$ obtenidos en los experimentos de depleción a 100°C.....	246
--	-----

<b>Tabla V.4.3.2.3.</b> Pendientes, coeficientes de regresión, eficacias de extracción y logaritmo de los valores de $K_{fs}$ obtenidos en los experimentos de depleción a 25°C.....	251
--	-----

<b>Tabla V.4.3.2.4.</b> Comparación del logaritmo de los valores de $K_{fs}$ obtenidos para los PCBs en otros trabajos publicados y los obtenidos para los PBDEs y PBBs en el presente estudio .....	251
--	-----

#### **IV.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS IGNIFUGOS FENÓLICOS EN MUESTRAS ACUOSAS AMBIENTALES..... 257**

<b>Tabla IV.5.1.3.</b> Condiciones instrumentales de GC-MS.....	262
---	-----

<b>Tabla IV.5.2.1</b> Tiempos de retención, iones de cuantificación e iones de identificación de los derivados acetilados de los compuestos bromados estudiados.....	263
--	-----

<b>Tabla IV.5.2.2.1.1.</b> Resultados del ANOVA para los nueve compuestos fenólicos estudiados, mostrando la significación estadística de los factores principales y sus interacciones....	267
--	-----

<b>Tabla IV.5.2.3.1.</b> Condiciones experimentales del método de determinación de BFRs fenólicos en muestras de agua.....	267
--	-----

<b>Tabla IV.5.2.3.2.1.</b> Coeficientes de correlación y valores de $F$ y $p$ para el test de fallo de ajuste, obtenidos en el estudio de la linealidad del método de HSSPME para los BFRs fenólicos.....	259
---	-----

<b>Tabla IV.5.2.3.2.2.</b> Límites de detección obtenidos mediante acetilación-in situ-HSSPME-GC-MS para los BFRs fenólicos incluidos en este estudio.....	269
--	-----

<b>Tabla IV.5.2.3.2.3.</b> Precisiones del método propuesto para la determinación de BFRs fenólicos.....	270
--	-----

<b>Tabla IV.5.2.6.1.</b> Recuperaciones (en %) de los BFRs fenólicos en las muestras reales estudiadas.....	271
---	-----

<b>Tabla IV.5.2.7.2.</b> Concentraciones (en ng/mL) de los compuestos fenólicos encontrados en las muestras reales analizadas, calculadas mediante calibrado externo.....	275
---	-----





## ÍNDICE DE FIGURAS

### II. INTRODUCCIÓN

#### II.1. FRAGANCIAS SINTÉTICAS..... 9

*Figura II.1.1.2.1. Uso (en porcentajes) de las fragancias por tipo de producto en la Unión Europea (UE)..... 13*

#### II.2. PLASTIFICANTES: FTALATOS..... 27

*Figura II.2.1.1. Estructura química del ácido ftálico y estructura general de un ftalato.... 27*

#### II.3. COMPUESTOS IGNÍFUGOS BROMADOS..... 51

*Figura II.3.1.1.2. Estructura general de los PBDEs y los PBBs (x e y pueden tomar valores de 1 a 5)..... 52*

*Figura II.3.1.1.1. Estructura del TBBPA..... 55*

*Figura II.3.1.2.1. Distribución (en %) de la aplicación de BFRs en diferentes productos de consumo..... 58*

#### II.4. LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) COMO ETAPA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA..... 73

*Figura II.4.1.1. Esquema del soporte de fibra..... 75*

*Figura II.4.1.2. esquema de las etapas de extracción y desorción del proceso de microextracción..... 76*

*Figura II.4.1.3.1. Modos de extracción: A) Extracción directa; B) Extracción en espacio de cabeza; C) Extracción con membrana de protección..... 77*

*Figura II.4.1.3.2. Posibles combinaciones de la SPME/derivatización..... 79*

*Figura II.4.2.2.1. Efecto de la variación del tiempo de extracción en la cantidad de analito extraída..... 84*

*Figura II.4.3.1.1. Guía de selección de las fibras de SPME en función de las propiedades del analito..... 88*

**II.5. NUEVAS APLICACIONES DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA..... 95**

**Figura II.5.1.1.1.** *Representación de la inyección de estándares y la inyección de SPME* 97

**Figura II.5.2.1.** *Correlación entre  $K_{fs}$  y  $K_{ow}$  encontrada en diferentes estudios.....* 100

**Figura II.5.2.2.** *Correlación entre  $K_{fs}$  y  $K_{ow}$  para PCBs y PAHs por separado en el estudio de Paschke y Popp.....* 101

**IV. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN**

**IV.1. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS SINTÉTICAS EN MUESTRAS ACUOSAS..... 123**

**Figura IV.1.1.1.3.** *Esquema del proceso de microextracción empleado en la determinación de fragancias nitrogenadas.....* 126

**Figura IV.1.1.2.1.** *Cromatograma de GC- $\mu$ ECD de un patrón de los cuatro nitrofragancias de 25 ng/mL en hexano.....* 129

**Figura IV.1.1.2.2.** *Espectros de masas de MX, MM, MT y MX, obtenidos en las condiciones experimentales indicadas en la Tabla IV.1.1.4.2.....* 130

**Figura IV.1.1.2.2.1.** *Comparación de la eficacia de microextracción de cinco fibras comerciales (respuestas expresadas como cuentas de área).....* 133

**Figura IV.1.1.2.2.2.** *Cartas Pareto estandarizadas de las cuatro fragancias consideradas*135

**Figura IV.1.1.2.2.3.** *Gráficas mostrando la influencia de los efectos principales en la extracción de las fragancias nitrogenadas.....* 136

**Figura IV.1.1.2.2.4.** *Superficie de respuesta estimada (cuentas de área) de los factores temperatura y modo de muestreo para cada compuesto (condiciones de SPME: PDMS-DVB, agitación y sin sal).....* 138

**Figura IV. 1.1.2.2.5.** *Curvas cinéticas para HSSPME de musk xylene, musk moskene y musk ketone (CAR-PDMS, 100°C).....* 139

**Figura IV.1.1.2.3.5.** *Cromatograma de  $\mu$ ECD de una muestra de influente de una planta de tratamiento de agua residual urbana.....* 143


**Figura IV.1.2.1.3.** *Esquema de procedimiento de SPME empleado en la determinación de fragancias policíclicas en agua.....* 149

**Figura IV.1.2.2.1.1.** *Cromatogramas de iones de un estándar de 10 ng/mL de las fragancias estudiadas.....* 152

**Figura IV.1.2.2.1.2.** *Espectros de masas de las fragancias consideradas, obtenidos en las condiciones experimentales indicadas en la Tabla IV.1.2.1.4.2.....* 153

**Figura IV.1.2.2.2.1.1.** *Valores de F normalizados (%) de los factores principales y las interacciones de segundo orden para cada una de las fragancias objeto de estudio.....* 159

<b>Figura IV.1.2.2.1.2.</b> <i>Gráficas de interacción fibra-temperatura de extracción (AB) para algunos compuestos representativos (resultados expresados en cuentas de área).....</i>	<b>160</b>
<b>Figura IV.1.2.2.1.3.</b> <i>Gráficas de interacción temperatura de extracción-modo de muestreo (BC) para algunas fragancias representativas (respuestas expresadas en cuentas de área).....</i>	<b>161</b>
<b>Figura IV.1.2.2.2.1.</b> <i>Efecto del volumen de muestra y del espacio de cabeza sobre la respuesta de las siete fragancias estudiadas (*en vial de 22 mL).....</i>	<b>163</b>
<b>Figura IV.1.2.2.2.2.</b> <i>Efecto de la agitación sobre la extracción de las siete fragancias consideradas.....</i>	<b>164</b>
<b>Figura IV.1.3.1.</b> <i>Cromatograma de iones de una disolución acuosa conteniendo las fragancias al nivel de los pg/mL.....</i>	<b>172</b>
<b>Figura IV.1.3.2.</b> <i>Cromatogramas de iones para una muestra de agua residual tomada en un colector urbano.....</i>	<b>174</b>
<b>IV.2. DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE AGUA.....</b>	<b>177</b>
<b>Figura IV.2.1.3.</b> <i>Esquema del procedimiento de SPME empleado en la determinación de ftalatos en agua.....</i>	<b>181</b>
<b>Figura IV.2.2.1.</b> <i>Anhídrido ftálico protonado.....</i>	<b>183</b>
<b>Figura IV.2.2.1.1.</b> <i>Gráficas de interacción fibra-temperatura de extracción para los seis ftalatos estudiados (resultados expresados en cuentas de área).....</i>	<b>186</b>
<b>Figura IV.2.2.1.2.</b> <i>Gráficas de interacción temperatura de extracción-modo de muestreo para los ftalatos incluidos en este estudio (respuestas expresadas en cuentas de área).....</i>	<b>188</b>
<b>Figura IV.2.2.1.3.</b> <i>Gráfica de interacción tipo de fibra-modo de muestreo para el DOP (respuestas expresadas en cuentas de área).....</i>	<b>189</b>
<b>Figura IV.2.2.2.1.</b> <i>Efecto de la agitación sobre la extracción de los seis ftalatos considerados.....</i>	<b>190</b>
<b>Figura IV.2.2.2.2.</b> <i>Efecto de la adición de sal sobre la DSPME de los seis ftalatos.....</i>	<b>191</b>
<b>Figura IV.2.2.2.3.</b> <i>Curvas cinéticas de la DSPME (PDMS-DVB, 100°C, con agitación) para los seis ftalatos estudiados (respuestas en cuentas de área).....</i>	<b>193</b>
<b>Figura IV.2.2.6.1.</b> <i>Cromatogramas de una muestra de agua tomada del influente de una planta de tratamiento de agua residual urbana.....</i>	<b>200</b>
<b>IV.3. DETERMINACIÓN DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs) EN MUESTRAS DE AGUA.....</b>	<b>203</b>

<b>Figura IV.3.1.2.</b> Esquema de proceso de SPME-GC-MS-MS seguido en la determinación de PBDEs y PBBs en agua.....	206
<b>Figura IV.3.2.1.1</b> Patrones de fragmentación de los compuestos BDE-47, PBB-49 y BDE-3 .....	210
<b>Figura IV.3.2.2.1.1.</b> Comparación de la eficacia de microextracción para cinco fibras comerciales (respuestas ponderadas a la respuesta de PDMS  ).....	213
<b>Figura IV.3.2.2.1.2.</b> Cartas Pareto estandarizadas para los efectos principales e interacciones del diseño experimental.....	115
<b>Figura IV.3.2.2.1.3.</b> Gráficas de efectos principales para los compuestos BDE-3, PBB-49, BDE-100 y BDE-153 (respuestas expresadas como cuentas de área).....	217
<b>Figura IV.3.2.2.1.4.</b> Gráficas de interacciones para los compuestos BDE-3, PBB-49, BDE-99 y BDE-153 (respuestas expresadas como cuentas de área).....	219
<b>Figura IV.3.2.2.2.1.</b> Efecto de la temperatura en la respuesta bajo las condiciones óptimas de extracción.....	221
<b>Figura IV.3.2.2.2.2.</b> Efecto del volumen de muestra (mL) en la respuesta bajo las condiciones óptimas dadas por el diseño (* en vial de 22 mL) (respuestas expresadas en cuentas de área).....	222
<b>Figura IV.3.2.2.4.1.</b> Curvas cinéticas para los compuestos PBB-49, BDE-47, BDE-99 y BDE-153 (respuestas en cuentas de área).....	224
<b>Figura IV.3.2.3.2.1.</b> Cromatograma de iones de una muestra de influente con adición de los compuestos al nivel de concentración indicado en la Tabla IV.4.2.3.3.1.....	229
<b>IV.4. ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE MICROEXTRACCIÓN (<math>K_{fs}</math>) DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs).....</b>	<b>233</b>
<b>Figura IV.4.2.2.1.</b> Esquema del procedimiento de SPME empleado en la determinación de $K_{fs}$ para PBDEs y PBBs en agua.....	238
<b>Figura IV.4.3.1.1.</b> Comparación entre la media de las respuestas obtenidas para cada compuesto (cuentas de área) en la inyección de 1 $\mu$ L de estándar: (a) preparado en disolventes difetetes, (b) utilizando tiempos de splitless diferentes.....	242
<b>Figura IV.4.3.2.1.</b> Cromatogramas de ión total de cinco microextracciones sucesivas (en escala de colores) de una muestra acuosa adicionada mediante GC-MS/MS.....	244
<b>Figura IV.4.3.2.2.</b> Depleción a 100°C: (A) Descenso en el área de pico con el número de extracciones; (B) Log (área de pico) vs. número de extracciones.....	245
<b>Figura IV.4.3.2.3.</b> Cinética de extracción para algunos compuestos representativos a 100°C. Ajuste según la Ecuación 5.1.10.....	247
<b>Figura IV.4.3.2.4.</b> Depleción a 25°C: (A) Descenso en el área de pico con el número de extracciones; (B) Log (área de pico) vs. número de extracciones.....	249

**Figura IV.4.3.2.5.** *Cinética de extracción para algunos compuestos representativos a 25°C. Ajuste según la Ecuación 5.1.10.*..... 250

**Figura IV.4.3.3.1.** *Correlación entre los  $K_{ow}$  determinados experimentalmente por Braekevelt et al. y los  $K_{fs}$  obtenidos en este estudio para los BFRs considerados a 25 y 100°C, y correlación entre los BCF obtenidos teóricamente y los  $K_{fs}$  a 100°C.*..... 253

#### **IV.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS IGNIFUGOS FENÓLICOS EN MUESTRAS**

##### **ACUOSAS AMBIENTALES.**..... **257**

**Figura IV.5.1.2.** *Esquema del procedimiento de SPME empleado en la determinación de BFRs fenólicos en agua.*..... 260

**Figura IV.5.2.1.** *Espectros de masas de los derivados acetilados los compuestos ignífugos bromados considerados en este estudio.*..... 264

**Figura IV.5.2.2.1.1.** *Gráficas de interacción fibra-temperatura de extracción para los nueve compuestos estudiados (resultados expresados en cuentas de área, x10000).*..... 269

**Figura IV.5.2.2.1.2.** *Gráficas mostrando el efecto combinado de los factores temperatura de extracción y modo de muestreo para los compuestos fenólicos incluidos en este estudio (respuestas expresadas en cuentas de área).*..... 271

**Figura IV.5.2.2.1.3.** *Cromatograma de masas de una muestra de agua Milli-Q con una concentración de 1 ng/mL tras la acetilación- in situ-SPME (PDMS, HSSPME, 100°C).*.. 273

**Figura IV.5.2.2.2.1.** *Efecto de la concentración de sal (% NaCl) en la HSSPME a 100°C de algunos compuestos representativos (respuestas expresadas en cuentas de área).*..... 274

**Figura IV.5.2.2.2.2.** *Efecto del volumen de muestra y del HS en la HSSPME a 100°C de los compuestos estudiados (respuestas expresadas en cuentas de área).*..... 275

**Figura IV.5.2.2.2.3.** *Efecto de la agitación sobre la extracción de algunos compuestos representativos (respuestas expresadas en cuentas de área).*..... 276

**Figura IV.5.2.2.2.4.** *Curvas cinéticas de la HSSPME con la fibra CAR-PDMS para algunos de los BFRs fenólicos estudiados (respuestas en cuentas de área).*..... 277

**Figura IV.5.2.7.1.** *Cromatogramas de iones seleccionados obtenido mediante HSSPME con la fibra de CAR-PDMS de una muestra de agua Milli-Q conteniendo 1 ng/mL de los compuestos fenólicos considerados.*..... 283

**Figura IV.5.2.7.2.** *Cromatograma de iones de una muestra de agua residual tomada en un colector urbano (HSSPME, 100°C, CAR-PDMS).*..... 286



## **I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**





## DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EMERGENTES EN MATRICES ACUOSAS

### I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Toda investigación científica surge para dar respuesta a problemas que afectan a la sociedad. En este sentido, la memoria de Tesis que se presenta intenta contribuir a la resolución de una de las problemáticas más importantes que se le plantean al hombre moderno, la contaminación del medio ambiente por sustancias químicas de origen antropogénico.

Durante décadas de desarrollo científico y tecnológico, se liberaron al medio ambiente multitud de sustancias químicas, sin una evaluación previa de las posibles consecuencias ambientales y toxicológicas. La preocupación sobre los posibles efectos adversos de estos contaminantes, tanto por parte de la comunidad científica, como de la sociedad en general, surge a comienzos de la década de los 60 con el nacimiento de la conciencia ambiental<sup>1</sup>.

Desde entonces, se han detectado en muestras ambientales un gran número de sustancias peligrosas para la salud humana y/o el medio ambiente. Este es el caso de los contaminantes orgánicos prioritarios (*Priority Organic Pollutants, POPs*), entre los que se incluyen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los bifenilos policlorados (PCBs), las dioxinas, los contaminantes fenólicos, especialmente los clorofenoles, o ciertos pesticidas. En base a estas investigaciones, el empleo de estos compuestos ha sido prohibido o restringido mediante la aplicación de diferentes legislaciones, tanto nacionales como internacionales, para reducir la exposición a los mismos.

En los últimos años, sin embargo, están comenzando a ser estudiados otros grupos de contaminantes orgánicos que se consideraban inocuos o cuya toxicidad es menos conocida. Son los denominados contaminantes emergentes<sup>2</sup>. Dentro de este grupo de agentes se incluyen productos de uso diario, tales como detergentes, fármacos, productos para el cuidado y la higiene personal (*Pharmaceutical and Personal Care Products, PPCPs*), plásticos o compuestos ignífugos.

La labor desempeñada por los químicos analíticos debe ir dirigida al desarrollo de métodos analíticos suficientemente sensibles y fiables para la detección y cuantificación de estos nuevos contaminantes ambientales en los distintos compartimentos medioambientales.

Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo principal de este trabajo de Tesis se centra en el desarrollo de metodología analítica para la determinación de varios grupos de compuestos químicos considerados contaminantes emergentes, entre los que se incluyen, las fragancias sintéticas, presentes en la formulación de productos de limpieza y cuidado personal, los ftalatos, utilizados como plastificantes en una inmensa variedad de productos, y los compuestos ignífugos bromados (*Brominated Flame Retardants*, *BFRs*), que presentan cierta similitud, en cuanto a su persistencia, con los PCBs o las dioxinas.

La mayoría de estos compuestos se liberan directamente al medio acuático a través de las descargas de origen doméstico, así como otro tipo de efluentes industriales o urbanos, o por lixiviación de los materiales que los contienen<sup>3-6</sup>, por lo que la investigación se ha enfocado hacia muestras acuosas de interés ambiental, como son las aguas residuales urbanas e industriales, aguas continentales o aguas para consumo humano.

Para el desarrollo de nuevos métodos se ha seleccionado la microextracción en fase sólida (SPME) como técnica analítica para la preparación de muestra, prestando especial interés a la optimización de los factores que afectan al proceso de microextracción. Para la optimización es muy útil el empleo de herramientas quimiométricas, en concreto, los diseños factoriales, que permiten obtener el óptimo experimental minimizando el tiempo y los recursos necesarios.

La determinación final se ha llevado a cabo en la mayor parte de los casos mediante cromatografía de gases (GC) como técnica de separación, acoplada fundamentalmente a espectrometría de masas (MS y MS-MS), ya que se trata de una técnica muy adecuada para el análisis de muestras ambientales, debido a su sensibilidad y a las ventajas típicas derivadas de la obtención de espectros de masas de los compuestos.

Mediante la utilización de estas herramientas analíticas y quimiométricas, se pretende obtener métodos de determinación sensible y con buena aplicabilidad al análisis de muestras reales pero a la vez rápidos y con la mínima generación de residuos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) R.L. Carson. Primavera silenciosa (1960). Ed. Crítica, Barcelona (2005).
- (2) C.G. Daughton, T.A. Ternes, Environ. Health Persp. 107 (1999) 907.
- (3) N. Paxeus, Wat. Res. 30 (1996) 1115.
- (4) G.G. Rimkus, B. Rimkus, M. Wolf, Chemosphere 28 (1999) 421.
- (5) R.A. Gimeno, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia 58 (2003) 37.
- (6) Y. Saito, M. Nojiri, M. Imaizumi, Y. Nakao, J. Chromatogr. A 975 (2002) 105.



## ***II. INTRODUCCIÓN***



## II.1. FRAGANCIAS SINTÉTICAS

### II.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

#### II.1.1.1 DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Las fragancias se pueden definir como mezclas complejas de distintos componentes químicos, que se emplean en la industria cosmética, en productos de limpieza y cuidado personal (PCPs), como jabones, cremas, detergentes, suavizantes y otros productos de uso doméstico. Su función es proporcionar al producto un aroma agradable y único, que permita al consumidor identificar un artículo determinado.

Dentro de los componentes responsables del olor característico de una fragancia, se encuentran los compuestos aromáticos sintéticos o fragancias sintéticas, denominados genéricamente como *musks* según la nomenclatura inglesa<sup>1</sup>.

Las fragancias sintéticas se pueden dividir en tres grandes grupos en función de su estructura química. Así, tenemos las fragancias sintéticas nitrogenadas (*nitromusks*), las fragancias sintéticas policíclicas (*polycyclic musks*) y fragancias sintéticas macrocíclicas (*macrocyclic musks*)<sup>2</sup>.

La familia de las *nitromusks* está constituida por un grupo de cinco nitrobencenos con diferentes grupos alquilo, denominados según la nomenclatura inglesa como: *musk ketone* (MK), *musk xylene* (MX), *musk tibetene* (MT), *musk ambrette* (MA) y *musk moskene* (MM).

Las fragancias sintéticas policíclicas son compuestos orgánicos derivados de la tetralina y el indano, sustituidos principalmente por grupos metilo. Los compuestos más representativos de este grupo son los conocidos por su nombre comercial: Galaxolide® (HHCB), Tonalide® (AHTN), Celestolide® (ADBI), Phantolide® (AHMI) y Traseolide® (ATII).

Por último, las fragancias sintéticas macrocíclicas presentan estructuras parecidas a los compuestos aromáticos naturales. Se trata fundamentalmente de cetonas macrocíclicas, lactonas, y bis-lactonas, cuya producción es extremadamente costosa, y que se caracterizan, además, por tener una limitada estabilidad química. En este grupo se incluye los compuestos denominados como: Ambrettolide, Civetone, Musk T (etilenbrasilato), Musk R1 y Muscone (el almizcle natural).

**Tabla II.1.1.1.1. Nombre común y químico, estructuras y propiedades físico-químicas de las fragancias considerados en este trabajo.** \*calculado teóricamente

Nombre común (acrónimo) y químico	Estructura	S (mg/L)	log K <sub>ow</sub>	H (atm.L/mol) <sup>9</sup>
<b>Fragancias nitrogenadas</b>				
Musk xylene (MX), 1-tert-butil-3,5-dimetil-2,4,6-dinitrobenzeno		0.15 <sup>3</sup>	4.9 <sup>3</sup>	7.73x10 <sup>-6</sup>
Musk ketone (MK), 3,5-dimetil-2,6-dinitro-1-tert-butil-acetilbenzeno		0.46 <sup>4</sup>	4.3 <sup>4</sup>	1.90x10 <sup>-6</sup>
Musk moskene (MM), 4,6-dinitro-1,1,3,3,5-pentametil lindano		0.046 <sup>5</sup>	5.3 <sup>6</sup>	1.54x10 <sup>-4</sup>
Musk tibetene (MT), 1-tert-butil-2,6-dinitro-2,4,5-trimetilbenzeno		0.052 <sup>5</sup>	5.0 <sup>6</sup>	9.96x10 <sup>-4</sup>
<b>Fragancias policíclicas</b>				
Celestolide®, 7-acetil-1,1-dimetil-6-tertbutilidihidroindeno (ADBI)		0.22*	5.4 <sup>7</sup> /5.4*	7.05x10 <sup>-3</sup>
Phantolide®, 6-acetil-1,1,2,3,3,5-hexametildihidroindeno (AHDl)		0.90*	4.9*	7.73x10 <sup>-3</sup>
Traseolide®, 5-acetil-1,1,2,6-tetrametil-3-isopropil-dihidroindeno (ATII)		0.30*	5.4*	1.94x10 <sup>-2</sup>
Galaxolide®, 1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilpentaciclo-(g)-2-benzopirano (HHCB)		1.75 <sup>7</sup> /0.19*	5.3 <sup>8</sup>	7.56x10 <sup>-4</sup>
Tonalide®, 7-acetil-1,1,3,4,4,6-hexametil-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (AHTN)		1.25 <sup>7</sup> /0.36*	5.4 <sup>8</sup>	1.09x10 <sup>-2</sup>
Cashmeran®, 1,2,3,5,6,7-hexahidro-1,1,2,3,3-pentametil-4,H-inden-4-ona (DPMI)		-	-	1.42x10 <sup>-1</sup>
<b>Fragancias macrocíclicas</b>				
Ambrettolide, (Z)-oxacicloheptadec-8-en-2-ona		0.59*	5.37*	-



En la **Tabla II.1.1.1** se recogen las estructuras y algunas propiedades físico-químicas, como la solubilidad en agua (S), el logaritmo de la constante de partición octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ) y la constante de Henry (H), para los compuestos incluidos en este estudio, de cada una de las familias.

En general, podemos decir que las propiedades que se relacionan con estas sustancias son solubilidad en agua y volatilidad relativamente bajas y una alta solubilidad en disolventes orgánicos y tejidos grasos<sup>10</sup>. El carácter lipofílico se refleja en los coeficientes de partición octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) que son relativamente altos.

Estas propiedades indican una clara tendencia a la adsorción en la materia orgánica, características que determinan su alta persistencia una vez introducidos en los compartimentos del medio natural. Teniendo en cuenta los valores de la constante de Henry, las fragancias nitrogenadas se pueden considerar semivolátiles o poco volátiles, por lo que la dispersión de estos compuestos por volatilización es pequeña, permaneciendo más tiempo en la fase acuosa.

Por otra parte, las fragancias nitrogenadas y policíclicas se caracterizan por presentar un potencial de biodegradación más bajo con respecto a la familia de las macrocíclicas. Sin embargo, se ha demostrado que son susceptibles a sufrir reacciones de biotransformación y fotodegradación, ya que en diversos estudios se han identificado diferentes metabolitos de estos compuestos<sup>10,11</sup>.

### **II.1.1.2. PRODUCCIÓN Y USOS**

Las fragancias naturales se usaron desde la antigüedad con fines medicinales y cosméticos; sin embargo, la producción a nivel industrial de las fragancias sintéticas se desarrolló a partir del siglo pasado, debido a la gran demanda existente en el mercado.

La primera fragancia sintética (MX) fue sintetizada por primera vez por Baur en 1888<sup>12</sup>. Más tarde, se sintetizaron otras fragancias nitrogenadas como, MK y MA, todos ellas productos de la nitración de compuestos aromáticos.

Las fragancias policíclicas se introdujeron en el mercado en la segunda mitad del siglo XX. Su síntesis industrial es más cara que la de las fragancias nitrogenadas; no obstante, las han sustituido paulatinamente durante las últimas décadas debido a la toxicidad demostrada para algunas nitrofragancias. De hecho, en 1994 se prohibió específicamente el uso y producción de MA por sus demostrados efectos neurotóxicos y de fotosensibilización<sup>13</sup>. La

retirada de las dos fragancias nitrogenadas más utilizadas, MX y MK, se espera para el 2008<sup>14</sup>.

En general, la producción de fragancias sintéticas en Europa es muy limitada. Lo que si existe es un gran volumen de importaciones y exportaciones, tanto de las sustancias puras como de los productos finales. No se dispone de datos fiables anteriores a 1992 sobre los volúmenes de consumo, pero por los datos disponibles a partir de esta fecha, se observa un descenso general en el consumo de fragancias<sup>15</sup>.

**Tabla II.1.1.2.1. Volúmenes de consumo (en toneladas/año) de fragancias sintéticas en Europa<sup>15</sup>.**

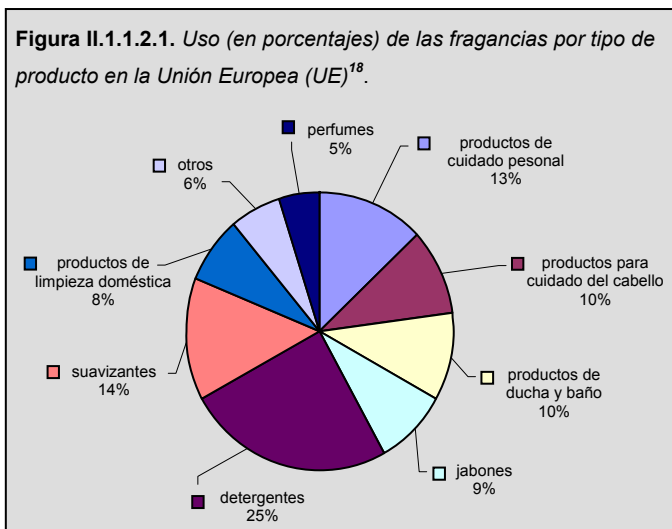
Compuesto	1992	1995	1998	2000
MX	174	110	86	67
MK	124	61	40	35
MM	-	5	*	*
MT	-	0.8	*	*
HHCB	2400	1482	1473	1427
AHTN	885	585	385	358
ADBI	-	34	18	14.9
AHMI	-	50	19	2.2
AITI	-	40	2	13.2

\*prohibida su producción y su consumo

Hoy en día, los compuestos que se emplean en mayor proporción, HHCB (Galaxolide) y AHTN (Tonalide), representan sobre el 95% del mercado total de fragancias sintéticas en Europa. Aunque todavía no existen suficientes estudios toxicológicos sobre las fragancias policíclicas, su uso también esta siendo limitado por su potencial poder de bioacumulación y baja biodegradabilidad<sup>16</sup>.

La tendencia actual es el empleo de fragancias macrocíclicas, porque su estructura es más parecida a la de las fragancias naturales y por tanto, son susceptibles a los procesos de biodegradación y no presentan efectos nocivos para la salud humana. De hecho, aunque no se dispone de datos sobre su consumo en Europa, su producción mundial supone entre un 3 y 4% del total de fragancias sintéticas<sup>17</sup>.

Tal como se ha mencionado anteriormente, los compuestos aromáticos sintéticos forman parte de la composición de la mayoría de las fragancias usadas en productos de limpieza y en productos cosméticos, como detergentes, suavizantes, jabones, cremas o perfumes (ver **Figura II.1.1.2.1**).



Cuando están presentes, la concentración de componentes sintéticos dentro de la fragancia varía entre un 2 y un 4%; y dentro del producto final la concentración de fragancia varía entre 0.2 y 1%, aunque en los productos cosméticos esta proporción puede ser todavía mayor.

### II.1.1.3 DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE

Dado que la producción de fragancias sintéticas en Europa es muy limitada, la principal vía de entrada de estos compuestos en el medioambiente se produce a través del consumo de productos que las contienen (ver **Figura II.1.1.2.1**).

Se trata de productos de uso doméstico, por lo que, se eliminan a través de los sistemas de desagüe que, finalmente, los conducen a las estaciones de tratamiento de agua residual (EDARs). La monitorización de los sistemas de depuración y de muestras medioambientales demuestra que las fragancias sintéticas están presentes en las aguas residuales urbanas en concentraciones elevadas y que en cierta medida se distribuyen en las aguas receptoras <sup>11,19,20</sup>.

La primera evidencia de contaminación del medio acuático fue detectada en 1981 por *Yamagishi et al.*<sup>21</sup>. En concreto, se identificó la presencia de MX y MK en peces. Posteriormente, en 1994, *Eschke et al.* identificaron por primera vez fragancias policíclicas en muestras de agua y peces de río, así como en muestras de aguas residuales urbanas<sup>22</sup>.

Estos primeros estudios confirman que el principal problema de contaminación de las fragancias sintéticas se produce en el medio acuático.

En la **Tabla II.1.1.3.1** se recogen las concentraciones encontradas en varios estudios recientes para tres fragancias policíclicas y dos fragancias nitrogenadas, en aguas superficiales y en los efluentes de plantas de tratamiento de agua residual.

**Tabla II.1.1.3.1.1.** Concentraciones (en pg/mL) de HHCB, AHTN, ADBI, MX y MK en muestras de agua (superficiales y efluentes de EDAR) de diferente procedencia.

Tipo de muestra (origen)	HHCB	AHTN	ADBI	MX	MK	Referencia
Agua de río (Alemania)	36-152	24-88	2-8	-	2-10	23
Agua de río (Japón)	0.7-100	-	-	4.1	9.9	24
Agua de río (UK)	-	-	-	2	3-7	25
Agua de mar (Mar del Norte)	0.09-0.88	0.09-0.94	-	-	-	26
Agua de lago (USA)	4.7	1.0	0.029	0.049	0.081	27
Efluente (Alemania)	600-2000	800-2400	40-70	30-310	220-1300	22
Efluente (Holanda)	1600	700	-	-	-	8
Efluente (Austria)	-	-	-	<10	38-53	28
Efluente (UK)	1000-4600	600-2700	-	40-200	10-170	25
Efluente (USA)	56.9	34.0	2.7	1.1	27.4	29

En general, se encuentran concentraciones más altas para HHCB y AHTN que para el resto de fragancias, en concordancia con los volúmenes de producción y uso (ver apartado anterior). Las concentraciones encontradas en las aguas superficiales son relativamente bajas, sobre todo para las aguas de lago y mar, debido a la dilución u otros factores de bioeliminación. En los estudios de aguas de río se encontró una relación proporcional entre la concentración y la distancia que existe entre el lugar de toma de muestra y la localización de una EDAR, así como del caudal y factor de dilución del río<sup>25</sup>.

Las concentraciones máximas de estos compuestos en los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual pueden llegar a los ng/mL. Esto nos da una idea de la contaminación potencial que existe en los medios acuáticos para estas dos sustancias. En cuanto a la relación de concentraciones entre HHCB y AHTN, es relevante el hecho de que se encuentren en el mismo orden de magnitud, teniendo en cuenta que el consumo de HHCB (Galaxolide) es hasta tres veces superior que el de AHTN (Tonalide) (ver **Tabla II.1.1.2.1**). Esta discrepancia puede deberse a diferencias en el comportamiento ambiental de ambas fragancias<sup>30</sup>.

Recientemente, se han publicado algunos estudios sobre el comportamiento de absorción de las fragancias sintéticas en las plantas de tratamiento de agua residual. En estos estudios se determinaron los coeficientes de partición de los compuestos en las distintas etapas de depuración del agua, y se llegó a la conclusión de que la absorción en los lodos desempeña el papel principal en la eliminación de estas sustancias del agua<sup>31</sup>. También se pudieron identificar algunos productos de degradación de HHCB por lo que, para este compuesto, los procesos de biotransformación también son relevantes<sup>32</sup>. La utilización de estos lodos como abonos en agricultura, así como el riego con efluentes de EDAR, constituye una importante vía de contaminación de los suelos y de los acuíferos subterráneos<sup>33</sup>.

Las concentraciones de ADBI (Celestolide), MK y MX son bastante inferiores, por lo que los métodos de análisis deben ser suficientemente sensibles para monitorizar estas especies. En algunos estudios se han identificado también ciertos amino metabolitos de MK y MX y que, en ocasiones, llegan a encontrarse en concentraciones más altas que los compuestos iniciales<sup>10,34</sup>. Estos metabolitos pueden ser más nocivos desde el punto de vista toxicológico que sus precursores, por lo que no debería subestimarse la contaminación por fragancias nitrogenadas, aunque se produzca en menor magnitud<sup>35</sup>.

Por otra parte, existen numerosas publicaciones que evidencian la presencia de fragancias sintéticas en muestras de peces, mejillones y otros animales acuáticos<sup>36-41</sup>. En general, se observa que las concentraciones encontradas están relacionadas con las concentraciones que existen en el agua y con el volumen del tejido adiposo del animal<sup>20,38</sup>.

Su presencia en este tipo de muestras nos da una idea de su afinidad por los tejidos biológicos. En este sentido, los valores de  $K_{ow}$  (ver **Tabla II.1.1.1**) son útiles para estimar la lipofilia de los compuestos y predecir su bioconcentración en los organismos acuáticos. Así, mientras las fragancias policíclicas presentan valores de  $\log K_{ow}$  del mismo orden de magnitud que los correspondientes a algunos pesticidas organoclorados y PCBs, para las fragancias nitrogenadas son algo más bajos. La biomagnificación a través de la cadena alimenticia no se produce<sup>2</sup>.

#### **II.1.1.4. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS**

Se han encontrado varios estudios respecto a la toxicidad que presentan las fragancias nitrogenadas en el medio acuático. Los resultados de los estudios más fiables se resumen en la **Tabla II.1.1.4.1**.

Se incluyen los valores estimados de  $EC_{50}$  (*Effect Concentration*, nivel de concentración del compuesto en el medio acuático que produce un efecto medible en la respuesta biológica en el 50% de la población del organismo seleccionado) o  $LC_{50}$  (*Letal Concentration*, nivel de concentración del compuesto en el medio que es letal para el 50% de la población del organismo seleccionado), así como los valores de NOEC (*No Observed Effect Concentration*, máxima concentración del compuesto usada en el estudio toxicológico que no presenta efectos estadísticamente significativos en la respuesta biológica del organismo comparada con el control) para algunas especies, como peces, bacterias o algas, que se utilizan como indicadores de la toxicidad global en el medio.

**Tabla II.1.1.4.1. Toxicidad de las fragancias nitrogenadas en el medio acuático<sup>42</sup>.**

Compuesto	Bacterias	Algas	Crustáceos	Peces
MM	<i>Vibrio fischeri</i> $EC_{50}$ 30 min > 0.037 mg/mL	<i>Scenedesmus subspicatus</i> $EC_{50}$ 72 h > 0.046 mg/mL	<i>Daphnia magna</i> $EC_{50}$ 48 h > 0.046 mg/mL	-
MT	<i>Vibrio fischeri</i> $EC_{50}$ 30 min > 0.042 mg/mL	<i>Scenedesmus subspicatus</i> $EC_{50}$ 72 h > 0.052 mg/mL	<i>Daphnia magna</i> $EC_{50}$ 48 h > 0.052 mg/mL	-
MK	<i>Vibrio fischeri</i> $EC_{50}$ 30 min > 0.34 mg/mL	<i>Scenedesmus subspicatus</i> $EC_{50}$ 72 h > 0.46 mg/mL <i>Selenastrum capricornutum</i> $EC_{50}$ 72 h = 0.244 mg/mL	<i>Daphnia magna</i> $EC_{50}$ 48 h > 0.46 mg/mL <i>Daphnia magna</i> $EC_{50}$ 21 d = 0.169-0.338 mg/mL	<i>Oncorhynchus mykiss</i> NOEC 21 d = 0.063 mg/mL
MX	<i>Vibrio fischeri</i> $EC_{50}$ 30 min > 0.12 mg/mL	<i>Scenedesmus subspicatus</i> $EC_{50}$ 72 h > 0.15 mg/mL <i>Selenastrum capricornutum</i> NOEC 5 d > 5.6 mg/mL	<i>Daphnia magna</i> $EC_{50}$ 48 h > 0.046 mg/mL <i>Daphnia magna</i> NOEC 21 d > 0.056 mg/mL	<i>Bluegill sunfish</i> $LC_{50}$ 96 h = 1.2 mg/mL <i>Brachydanio rerio</i> $EC_{50}$ 14 d = 0.4 mg/mL

MK y MX son los compuestos más tóxicos de este grupo en el medio acuático, a la vista de los resultados. Los valores de NOEC más bajos publicados para estos dos compuestos son 0.063 mg/mL (en peces) para MK y 0.056 mg/mL (en crustáceos), y son los que se han usado en la evaluación del riesgo ambiental (*Environmental Risk Assessment*) de estos compuestos<sup>41</sup>.

También se ha evaluado la toxicidad de las fragancias policíclicas en el ambiente acuático, y los valores más relevantes de estos estudios se recogen en la **Tabla II.1.1.4.2**

Tal como ocurre en el caso de las nitrogenadas, los compuestos más usados de este grupo, HHCB y AHTN, son los que presentan una mayor toxicidad en el medio acuoso. Los valores de NOEC más bajos encontrados son 0.068 mg/mL (peces) para HHCB y 0.035 mg/mL (peces) para AHTN, también utilizados en la evaluación del riesgo para estos compuestos<sup>41</sup>.

Tabla II.1.1.4.2. Toxicidad de las fragancias policíclicas en el medio acuático<sup>42</sup>.

Compuesto	Algas	Crustáceos	Peces
AITI	-	<i>Daphnia magna</i> EC <sub>50</sub> 48 h = 0.42 mg/mL	-
AHDI	<i>Selenastrum capricornutum</i> EC <sub>50</sub> 72 h = 0.2 mg/mL NOEC = 0.044 mg/mL	<i>Daphnia magna</i> EC <sub>50</sub> 48 h = 0.33 mg/mL	<i>Brachydanio rerio</i> NOEC 96 h = 0.9 mg/mL
HHCB	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> EC <sub>50</sub> 72 h = 0.723 mg/mL	<i>Daphnia magna</i> NOEC 21 d = 0.111 mg/mL	<i>Lepomis macrochirus</i> NOEC 21 d = 0.182 mg/mL <i>Pimephales promelas</i> NOEC 36 d = 0.068 mg/mL
AHTN	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> EC <sub>50</sub> 72 h = 0.468 mg/mL	<i>Daphnia magna</i> NOEC 21 d = 0.196 mg/mL	<i>Lepomis macrochirus</i> NOEC 21 d = 0.314 mg/mL <i>Pimephales promelas</i> NOEC 36 d = 0.035 mg/mL

En general, la evaluación del riesgo de un agente químico, consiste en la comparación de las concentraciones de exposición ambiental (*Pernicious Effect Concentration*, *PEC*) medidas o estimadas, con la concentración conocida o predicha que no produce efectos en el organismo (*Pernicious No Effect Concentration*, *PNEC*). Así, cuando la relación entre *PEC* y *PNEC* es inferior a la unidad, se considera que el riesgo de peligro ambiental no es significativo. Tanto para MX y MK, como para HHCB y AHTN, los valores de la relación entre *PEC* y *PNEC* son inferiores a la unidad tanto en el medio acuático, como en los sedimentos y en el suelo<sup>30</sup>. Sin embargo, se necesitan más datos para poder precisar más estas valoraciones, por ejemplo, evaluando la toxicidad de los posibles metabolitos que puedan generarse en los procesos de degradación.

Por otra parte, las fragancias sintéticas son diseñadas en muchas ocasiones para imitar el olor de las fragancias naturales, que para muchas especies son feromonas. Por tanto, puede asumirse, que si las fragancias sintéticas se introducen en cantidades altas en el medio acuático, podrían producir confusión o aturdimiento en los animales e incluso alterar su sistema reproductor y endocrino<sup>2</sup>. Aunque esto sólo se va a producir con especies cuyas feromonas específicas coincidan estructuralmente con las fragancias.

En humanos, la principal vía de exposición no laboral a las fragancias sintéticas es la absorción de los compuestos a través de la piel cuando se produce el contacto con productos cosméticos o con productos de limpieza. La asimilación a través de la dieta es menos importante<sup>42,43</sup>.

En cuanto a los problemas que producen sobre la salud humana, aunque en general la toxicidad aguda de las fragancias sintéticas es baja, las nitrogenadas son más nocivas a largo plazo que las fragancias policíclicas. Por ejemplo, se ha demostrado que MA y AHTN (Versalide) muestran efectos neurotóxicos. En estudios con animales, también se ha puesto de manifiesto que MX presenta efectos carcinogénicos y se sospecha, aunque no ha sido demostrado, que MK puede aumentar el efecto carcinogénico de otros materiales<sup>43,44</sup>.

**II.1.2. ANÁLISIS EN MUESTRAS ACUOSAS AMBIENTALES****II.1.2.1 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA****II.1.2.1.1. Problemas de contaminación**

La contaminación durante el tratamiento de las muestras puede ser un problema en el análisis de estos compuestos en agua, ya que las fragancias sintéticas están presentes en multitud de productos de uso común. Sin embargo, esta contaminación puede minimizarse o incluso eliminarse, siguiendo una serie de precauciones durante el procesado de la muestra, como el uso de material de vidrio siguiendo un protocolo de lavado sin el uso de detergentes y secado a temperatura alta, el uso de guantes de nitrilo sin polvo y evitando la aplicación de productos cosméticos (cremas, perfumes) por parte del analista<sup>1,26,27,40,45</sup>. Además, debe tenerse especial cuidado en evitar la contaminación procedente del ambiente del laboratorio, mediante el almacenamiento del material y las muestras en una zona adecuada<sup>46</sup>. En cualquier caso, antes de comenzar un análisis deben chequearse los niveles de contaminación, mediante la realización de blancos del método. Normalmente, en el análisis de aguas, las muestras utilizadas como blancos son agua destilada<sup>1</sup> o agua Milli-Q<sup>45</sup>.

**II.1.2.1.2. Conservación y pretratamiento de las muestras.**

Las muestras de agua para la determinación de fragancias sintéticas pueden conservarse refrigeradas a 4°C y en ausencia de luz (botellas de vidrio ámbar), a su pH natural. El período máximo de almacenamiento suele ser de entre uno y cuatro días, para garantizar su estabilidad. En algunos casos, también se recomienda la adición de cierta cantidad de disolvente orgánico (0.2 % p/v)<sup>47</sup>, para evitar la adsorción de los compuestos en las paredes del material de vidrio. Además, antes de la extracción, las muestras que presentan un contenido alto de partículas sólidas en suspensión, deben filtrarse. Normalmente, se utilizan filtros de fibra de vidrio de entre 0.45 y 5.0 µm, sometidos a un tratamiento de limpieza previo<sup>19,47</sup>.



### II.1.2.1.3. Extracción

Aunque se han propuesto procedimientos de extracción y preconcentración de fragancias sintéticas mediante la extracción líquido-líquido (LLE)<sup>26,27,45</sup>, el procedimiento más usado con muestras de agua es la extracción en fase sólida (SPE), tanto en el modo off-line<sup>19,25,29,40,48</sup> como en el modo on-line<sup>47</sup>, y mediante extracción con discos de membrana<sup>1,49</sup>. En algunos casos, se han propuesto métodos de extracción *in-situ* de la muestra acuosa<sup>29,40</sup>, como en efluentes de EDARs. Otras técnicas de extracción rápidas y adecuadas para el muestreo de aguas son la microextracción en fase sólida (SPME)<sup>50,52</sup>.

#### II.1.2.1.3.1 Extracción líquido-líquido (LLE)

En general, las extracciones se realizan en discontinuo, con embudos de decantación, y utilizando un volumen de muestra grande<sup>27,45</sup>. Entre los disolventes empleados se encuentran, el tolueno, el ciclohexano o el pentano. *Fromme et al*<sup>51</sup>, propusieron un método de destilación y extracción simultánea (SDE, *simultaneous steam-distillation/solvent extraction*), el cual permite minimizar el volumen de disolvente utilizado. Además, utilizaron cloruro sódico para aumentar la eficacia de extracción.

Una vez obtenido el extracto, se eliminan los restos de agua que pueda contener, en algunos casos, mediante congelación a -20°C<sup>45</sup> o con sulfato sódico anhidrido<sup>27,51</sup>, y finalmente se concentra. Normalmente no suele ser necesaria ninguna etapa de limpieza de los extractos (tanto de LLE como SPE). En el caso de ser necesaria, la limpieza con columnas de silica gel suele ser la opción seleccionada<sup>27,48</sup>. El uso de florisil no se recomienda, porque pueden producirse pérdidas debido a adsorciones irreversibles de las fragancias en el adsorbente.

Los LODs más bajos obtenidos con esta técnica fueron de 3 y 1 pg/mL para HHCB y AHTN, respectivamente<sup>45</sup>.

#### II.1.2.1.3.2 Extracción en fase sólida (SPE)

Tal como se mencionó, la SPE es una de las técnicas de extracción más empleadas para el análisis en muestras de agua de fragancias sintéticas<sup>19,25,29,40,47,48</sup>.

La ventaja que presenta esta técnica respecto a la LLE, es que se puede obtener un mayor nivel de concentración con el empleo de menos volumen de disolvente orgánico. Su limitación es el análisis de muestras con un alto contenido en sólidos, y que los volúmenes de muestra necesarios siguen siendo relativamente altos. En el caso de muestras complejas, el problema se soluciona mediante la filtración, analizando por separado la fase líquida y la fase sólida.

Otra ventaja de la SPE, es que se puede usar tanto en modo discontinuo (*off-line*), como en modo continuo (*on-line*). En los métodos propuestos basados en SPE *off-line*, se necesitan volúmenes grandes de muestra (entre 200 y 2000 mL)<sup>19,48</sup>. Se emplean tanto cartuchos disponibles comercialmente, como elaborados en el propio laboratorio, y los materiales adsorbentes más usados son, el octadecilsilano (C-18)<sup>19,47</sup> y la fase polimérica basada en poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB)<sup>29,40,48</sup>. También se han aplicado otro tipo de fases como la resina XAD-2, aunque las recuperaciones obtenidas con este material son peores<sup>27</sup>. Los disolventes empleados para eluir las fragancias del cartucho son disolventes orgánicos, como hexano, metanol, diclorometano o mezclas de estos disolventes. *Osenwengie y Steinberg*<sup>40</sup> han propuesto un método de SPE para el muestreo *in-situ* de efluentes, en el que la muestra es tomada directamente de la corriente de efluente durante 5 horas (45-85 L), a través de un sistema de filtrado, compuesto por lana de vidrio desactivada con un 5% de dimetildiclorosilano (DMDCS) y un filtro de 5 µm de tamaño de poro, y bombeada a través de un cartucho con 6 g de adsorbente Nexus®, en el que se combinan las fases poliméricas polimetilmetacrilato y PS-DVB (1:1)<sup>29,40</sup>. El cartucho es posteriormente tratado en el laboratorio donde se eluyen los compuestos y se concentra el eluato. Las recuperaciones obtenidas con este sistema fueron satisfactorias (90-97%). Otra opción para la monitorización *in situ* de las fragancias en medios acuosos, son los dispositivos de membrana semipermeable (SPMD), utilizados por *Gatermann et al.* en el muestreo de efluentes de EDAR y aguas superficiales (río)<sup>39,41</sup>.

Además de los cartuchos, se han empleado discos en la SPE de estos compuestos<sup>1,49</sup>. La ventaja que presentan los discos, es que el flujo de muestreo es mayor, y por tanto, se puede procesar más rápido un mayor volumen de muestra.

Por otra parte, *Enoch et al.* han propuesto un método de SPE en modo continuo<sup>47</sup> para el análisis de MX y MK, acoplada a GC-ECD. El sistema está compuesto por dos partes, una que controla la etapa de SPE (C-18), y otra que controla la transferencia de los compuestos al sistema cromatográfico mediante una serie de bucles. Además, son necesarios un *gap* de retención, funcionando a modo de inyector, y una precolumna, para retener los compuestos y eliminar el disolvente, antes de su evaporación hacia la columna cromatográfica.

### II.1.2.1.3.3 Microextracción en fase sólida (SPME)

Hasta el momento, se han publicado muy pocas aplicaciones de la SPME al análisis de fragancias en muestras de agua. Sin embargo, éstas demuestran el potencial de la SPME para la determinación de este tipo de compuestos. Supone una alternativa muy interesante ya que se reduce el riesgo de contaminación durante el tratamiento de muestra, además de ser una técnica que no necesita el uso de disolventes orgánicos y requiere el empleo de poco volumen de muestra.

*Heberer et al.*<sup>50</sup> propusieron la primera aplicación de la SPME para la determinación en agua, tanto de fragancias policíclicas (HHCB, AHTN y ADBI), como la familia completa de fragancias nitrogenadas, empleando GC-MS para el análisis. El método propuesto consistió en el muestreo directo de 4 mL de muestra durante 40 minutos usando una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm, a temperatura ambiente y con agitación. No obstante, no se optimizó ninguno de estos parámetros, por lo que los LODs obtenidos (<10 ng/L) podrían ser mejores. Además el tiempo de análisis necesario resultó excesivamente largo (76 min).

Por otra parte, Winkler et al.<sup>52</sup> optimizaron diferentes parámetros de la SPME de cuatro fragancias (HHCB, AHTN, ADBI y MK), incluyendo el tipo de fibra, obteniendo las mayores respuestas con la fibra de PDMS-DVB. Sin embargo, no estudiaron la influencia de otros factores importantes, como el modo de muestreo (directo) o la temperatura de extracción (30°C), pudiendo obtener mejores resultados muestreando el espacio de cabeza (HS) o aplicando otra temperatura.

De hecho, la viabilidad de la extracción en el HS de las fragancias, tanto policíclicas como las nitrogenadas, consideradas compuestos poco volátiles por sus constantes de Henry, se confirma con la aplicación de la técnica de extracción CLSA (*Closed Loop Stripping Analysis*) propuesta recientemente por *Mitjans y Ventura*<sup>53</sup>.

### II.1.2.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

La técnica híbrida cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS) es una de las técnicas de separación y detección más versátiles y utilizadas en el análisis de fragancias sintéticas en muestras ambientales, incluyendo muestras de agua<sup>20</sup>. El espectro de masas por EI (ionización electrónica) proporciona varios fragmentos de masas características, que pueden ser usados para la identificación de los compuestos y el análisis rutinario.

Además, son adecuados como iones específicos en el modo SIM (Selected Ion Monitoring)<sup>22,43,49</sup>, por lo que, la técnica GC/EI/MS(SIM) permite la detección de las fragancias con un alto nivel de selectividad y sensibilidad. Para el análisis de trazas, se han aplicado diferentes sistemas espectrométricos, como el espectrómetro de masas de cuadrupolo<sup>19,27,40,43,48,49</sup>, sistemas de trampa de iones<sup>22,41,51,52</sup> y sistemas híbrido<sup>26</sup>.

La técnica de espectrometría de masas en tandem (GC/MS/MS) con trampa de iones reduce considerablemente el ruido de fondo, y por tanto, se aumenta la sensibilidad y selectividad analíticas<sup>22</sup>.

En general, las columnas de separación empleadas presentan recubrimientos de dimetilpolisiloxano modificado con diferentes proporciones de fenilmetilpolisiloxano (1 ó 5%), con dimensiones comprendidas entre 25-30 m de longitud x 0.22-0.35 mm de diámetro interno, lo que permite conseguir la separación con una buena resolución y un tiempo de análisis relativamente corto, en función del programa de temperaturas establecido. Ciertas fragancias como la HHCB, AHTN y ATII presentan diferentes diastereoisómeros, aunque su separación no es posible con columnas cromatográficas convencionales. En este caso sería necesario el uso de columnas quirales<sup>32</sup>.

Debido a su estructura química, las fragancias policíclicas no pueden detectarse con suficiente sensibilidad con otros detectores selectivos, como el detector de captura electrónica (ECD) o el detector de nitrógeno y fósforo (NPD), a diferencia de las fragancias nitrogenadas que presentan una buena sensibilidad con estas técnicas<sup>44,47</sup>. Para la determinación simultánea de ambas familias de fragancias en agua, se han desarrollado distintos métodos con la MS como técnica de detección<sup>22,27,40,49,53</sup>. El principal inconveniente de estos métodos es la baja sensibilidad que presenta la ionización electrónica en la detección de las fragancias nitrogenadas. *Rimkus y Wolf*<sup>36</sup> compararon los resultados obtenidos mediante GC/NCI/MS y mediante GC/EI/MS, llegando a la conclusión de que con la ionización química se obtenía una mayor sensibilidad para las fragancias nitrogenadas, ya que forman con facilidad iones negativos; por lo que, aunque esta técnica es menos sensible para las policíclicas, esta pérdida de sensibilidad se compensa debido a que se encuentran en unas concentraciones más altas.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detector fluorescente o ultravioleta, también se ha aplicado en la determinación de fragancias en muestras de agua, sin embargo en comparación con la técnica GC-MS, este método presenta una pobre eficacia en la separación y una sensibilidad moderada<sup>54</sup>.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) S.L. Simonich, W.M. Begley, G. Debaere, W.S. Eckhoff, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 954.
- (2) Fragrances 2000, draft for public hearing, Swedish Society for Nature Conservation, Foundations concerning criteria BRA MILJÖVAL, Estocolmo, 2000.
- (3) Risk Assessment Musk Xylene. European Union Risk Assessment Report. Final draft June 2003.
- (4) Risk Assessment Musk Ketone. European Union Risk Assessment Report. Final draft June 2003.
- (5) W. Schramm, A. Kaune, B. Beck, W. Thumm, A. Behechti, A. Kettrup, P. Nickolova, Wat. Res. 30 (1996) 2247.
- (6) Partition coefficient n-octanol/water of Galaxolide according to OECD Guideline No. 117. Givaudan Roure Corporate Safety and Environmental Affairs. Test report No. 93- E67, 1993.
- (7) F. Balk, R.A. Ford. Toxicology Letters 111 (1999b) 81.
- (8) Distribution behaviour of polycyclic musks in sewage treatment plants and in biota. Interpretation of data using free and total concentration measurements. E. Artola-Garciana. Tesis perteneciente al Institute for Risk Assessment Sciences IRA, Utrecht, Holanda, 2002.
- (9) L.I. Osemwengie, S. Steinberg, J. Chromatogr. A 993 (2003) 1.
- (10) R. Gaterman, H. Hühnerfuss, G. Rimkus, A. Attar, A. Kettrup, Chemosphere 36 (1998) 2535.
- (11) C.G. Daughton, T.A. Ternes, Environ. Health Persp. 107 (1999) 907.
- (12) A. Baur, Ver. Dtsch. Chem. Ges 24 (1891) 2832.
- (13) International Fragrance Association: Code and Standards, International Fragrance Association (IFRA), Ginebra, Suiza, 1994.
- (14) OSPAR Commission, OSPAR background document on musk xylene and other musks, ISBN 1-904426-36-0, 2004.
- (15) Letter of IFRA to SGCI for Swiss authorities (BUWAL) reporting on use volume survey, International Fragrance Association (IFRA), Ginebra, Suiza, 2002.

- (16) W.M.G.M. van Loon, M.E. Verwoerd, F.G. Wijnker, C.J. van Leeuwen, P. van Duyn, C. van de Guchte, J.M.L. Hermens, *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (1997) 1358.
- (17) A. Rebmann, C. Wauschkuhn, W. Waizenegger. Bedeutung der Moschusduftstoffen im Wandel der Zeit. *Dragoco Report* 2/1998:48, 1998.
- (18) F. Balk, J. Blok, D. Salvito. Environmental risks of musk fragrance ingredients. En: *American Chemical Society Symposium Series 791, Pharmaceutical and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. C.G. Daughton y T. Jones-Lepp. American Chemical Society, Washington DC, 2001.
- (19) N. Paxeus, *Wat. Res.* 30 (1996) 1115.
- (20) G.G. Rimkus, B. Rimkus, M. Wolf, *Chemosphere* 28 (1999) 421.
- (21) T. Yamagishi, T. Miyazaki, S. Horii, S. Kaneko, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26 (1981) 656.
- (22) H.-D. Eschke, J. Traus, H.-J. Dibowski, *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* 1. Mitteilung, 6 (1994) 183. 2. Mitteilung, 7 (1994) 131.
- (23) M. Winkler, G. Kopft, C. Hauptvogel, T. Neu, *Chemosphere* 37 (1998) 1139.
- (24) S.-J. Yun, T. Teraguchi, X.-M. Zhu, K. Iwashima, *J. Environ. Chem* 4 (1994) 325.
- (25) S.L. Simonich, T.M. Federle, W.S. Eckhoff, A. Rottiers, S. Webb, D. Sabaliunas, W. de Wolf, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2839.
- (26) K. Bester, H. Hühnerfuss, W. Lange, G. G. Rimkus, N. Theobald, *Wat. Res.* 32 (1998) 1857.
- (27) A.M. Peck, K.C. Hornbuckle, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 367.
- (28) H. Hohenblum, R. Sattelberger, S. Scharf. Abwasser- und Klärschlammuntersuchungen in der Pilotkläranlage. Entsorgungsbetriebe Simmering. Umweltbundesamt Wien, ISBN 3-85457-537-8, 2000.
- (29) L.I. Osemwengie, S.L. Gerstenberger. *J. Environ. Monit.* Published on the web of The Royal Society of Chemistry (2004).
- (30) E.J. van de Passche, F. Balk. Environmental risk assesment of the polycyclic musks AHTN and HHCB according to the EU-TGD. RIVM report no. 601 503 008. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Holanda, 1997.

- (31) T.A. Ternes, N. Herrmann, M. Bonerz, T. Knacker, H. Siegrist, A. Joss, *Wat. Res.* 38 (2004) 4075.
- (32) S. Franke, C. Meyer, N. Heinzel, R. Gatermann, H. Hühnerfuss, G. Rimkus, W.A. Koningg, W. Francke, *Chirality* 11 (1999) 795.
- (33) J.A. Pedersen, M. Soliman, I.H. Suffet, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1625.
- (34) D. Herren, J.D. Berset, *Chemosphere* 40 (2000) 565.
- (35) H.U. Käfferlein, T.A. Göen, *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (1998) 431.
- (36) G.G. Rimkus, M. Wolf, *Chemosphere* 30 (1995) 641-651.
- (37) J. Hajslova, P. Gregor, V. Chladkova, K. Alterova, *Organohal. Comp.* 39 (1998) 253.
- (38) R. Draisci, C. Marchiafava, E. Ferretti, L. Palleschi, G. Catellani, A. Anastasio, *J. Chromatogr. A* 814 (1998) 187.
- (39) R. Gatermann, J. Hellou, H. Hühnerfuss, G. Rimkus, V. Zitko, *Chemosphere* 38 (1999) 3431.
- (40) L.I. Osemwengie, S. Steinberg, *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 107.
- (41) R. Gatermann, S. Biselli, H. Hühnerfuss, G.G. Rimkus, M. Hecker, L. Karb, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42 (2002) 437.
- (42) Draft background document concerning the elaboration of programmes and measures on musk xylene and other musks. OSPAR Commission, Bern-Ittigen, Suiza, 1999.
- (43) G.G. Rimkus, M. Wolf, *Chemosphere* 33 (1996) 2033.
- (44) G.G. Rimkus, W. Butte, H. Geyer, *Chemosphere* 35 (1997) 1497.
- (45) K. Bester, *J. Environ. Monit.* 7 (2005) 43.
- (46) R. Kallenborn, R. Gatermann, S. Planting, G.G. Rimkus, M. Lund, M. Schlabach, I.C. Burkow, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 295.
- (47) P. Enoch, A. Putzler, D. Rinner, J. Schlüter, *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 75.
- (48) I.J. Buerge, H.-R. Buser, M.D. Müller, T. Poiger, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5636.
- (49) E. Verbruggen, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 801.

- (50) T. Heberer, S. Gramer, H.J. Stan, Acta Hydrochim. Hydrobiol. 27 (1999) 150.
- (51) H. Fromme, T. Otto, K. Pilz, Wat. Res. 35 (2001) 121.
- (52) M. Winkler, J.V. Headley, K.M. Peru, J. Chromatogr. A 903 (2000) 203.
- (53) D. Mitjans, F. Ventura, Water Sci. Technol. 52 (2005) 145.
- (54) W. Schüssler, L. Nitschke, Fresenius J. Anal. Chem. 361 (1998) 220.

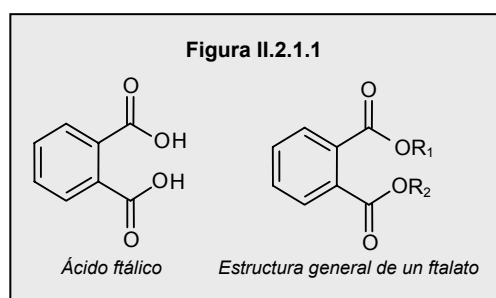


## II.2. PLASTIFICANTES: FTALATOS

### II.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

#### II.2.1.1. DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Ftalato es el término genérico con el que se denomina a los ésteres o diésteres del ácido ftálico (ácido 1,2-bencenodicarboxílico). En la **Figura II.2.1.1** se muestra la estructura química del ácido ftálico, así como la estructura general de un ftalato.



Su síntesis industrial consiste en la esterificación del ácido ftálico con el correspondiente oxo alcohol en presencia de un ácido como catalizador. Se trata de un grupo muy amplio de compuestos, ya que hay una gran variedad de alcoholes que pueden reaccionar con el ácido ftálico para dar diferentes ftalatos, en los que sólo variará la cadena carbonada (R). Sin embargo, sólo alrededor de 60 tienen aplicaciones industriales (ver **Tabla II.2.1.1.1**) y, dentro de estos, sólo unos pocos se producen a gran escala, siendo el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) el de mayor volumen de producción a nivel mundial.

Industrialmente, el término “iso” indica que se trata de una mezcla de isómeros y no se refiere al significado que se le da según la nomenclatura de la IUPAC. Además, con este término también se entiende que se trata de isómeros ramificados, mientras que el término “-n-” se utiliza con los isómeros lineales. Los compuestos de mayor peso molecular (excepto el DEHP) también son mezclas de isómeros, basadas en los alcoholes usados en su producción. Por ejemplo, el DNP se trata de una mezcla de ésteres con cadenas de 8 a 10 carbonos, predominando los isómeros con 9 carbonos.

En general, los ftalatos son compuestos estables, en estado líquido a temperatura ambiente, y con un ligero aroma. Presentan un rango muy amplio de propiedades físico-químicas en función de su peso molecular.

**Tabla II.2.1.1.1.** Nombre, acrónimo y grupos característicos de algunos ftalatos con aplicaciones industriales<sup>1</sup>.

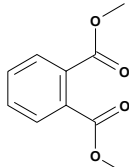
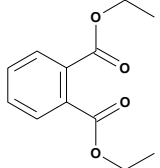
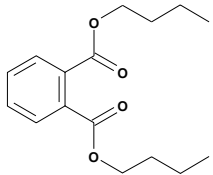
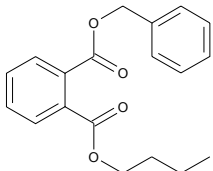
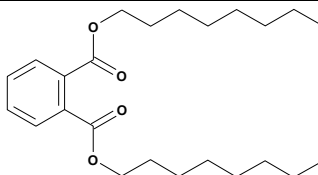
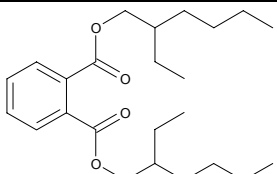
Nombre	Acrónimo	R <sub>1</sub> y R <sub>2</sub>
Ftalato de dimetilo	DMP	CH <sub>3</sub>
Ftalato de dietilo	DEP	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Ftalato de diisobutilo	DIBP	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Ftalato de di-n-butilo	DBP	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
Ftalato de di (metoxietilo)	DMEP	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>
Ftalato de di (metilpentilo)	DMPP	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH((CH) <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Ftalato de bis (etoxietilo)	DEEP	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Ftalato de di-n-hexilo	DHP	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>
Ftalato de butilbencilo	BBP	R <sub>1</sub> =(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
Ftalato de hexil-2-etilhexilo	HEHP	R <sub>1</sub> =(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> =(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>
Ftalato de di (2-n-butoxietilo)	DBEP	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
Ftalato de di (2-etilhexilo)	DEHP	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )((CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> )
Ftalato de dicitlohexilo	DCHP	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>
Ftalato de di (n-octilo)	DOP	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>
Ftalato de di (n-nonilo)	DNP	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>

En la **Tabla II.2.1.1.2** se muestra la estructura y principales propiedades físico-químicas de los seis ftalatos objeto de estudio en este trabajo y que están incluidos en la lista de contaminantes prioritarios publicada por la EPA.

Los ftalatos de mayor peso molecular se pueden considerar poco solubles, mientras que los de menor peso molecular son moderadamente solubles. Los valores de log K<sub>ow</sub> indican que la lipofilia de los ftalatos aumenta con la longitud de la cadena carbonada, así los compuestos de cadenas carbonadas más largas, tendrán tendencia a acumularse en muestras ambientales con alto contenido en materia grasa<sup>3</sup>.

Los ftalatos menos pesados, es decir, los de cadena carbonada más corta, presentan presiones de vapor altas, por lo que, en estado puro son relativamente volátiles. Sin embargo, sus valores de la constante de Henry son bajos, lo que significa que el proceso de vaporización en disolución acuosa es lento. Basándose en los valores para los compuestos de mayor peso molecular, su vaporización desde el agua podría producirse de manera más rápida, pero estos compuestos van a tener tendencia a fijarse en la materia sólida en suspensión debido a su hidrofobicidad, por lo que su difusión de las aguas naturales a la atmósfera es poco probable<sup>4</sup>.

**Tabla II.2.1.1.2. Estructura y propiedades físico-químicas de los ftalatos objeto de estudio en este trabajo<sup>2-4</sup>.**

Compuesto	Estructura	S (mg/L)	P (Pa)	Log K <sub>ow</sub>	H <sup>H</sup> (Pa m <sup>3</sup> /mol)
DMP		5220	0.263	1.61	$9.78 \cdot 10^{-3}$
DEP		591	$6.48 \cdot 10^{-2}$	2.54	$2.44 \cdot 10^{-2}$
DBP		10	$2.49 \cdot 10^{-3}$	4.57	0.27
BBP		3.8	0.97	4.70	0.205
DOP		$5.1 \cdot 10^{-3}$	$1.91 \cdot 10^{-2}$	5.22	1.70
DEHP		$2.49 \cdot 10^{-3}$	$2.52 \cdot 10^{-5}$	7.73	3.95

## II.2.1.2. PRODUCCIÓN Y USOS

Los ftalatos son compuestos con diversos usos industriales, sintetizados a gran escala. De hecho, se estima que la producción de ftalatos a nivel mundial en la década de los 90 alcanzó los 4 millones de toneladas por año<sup>5</sup>. En cuanto a la producción a nivel europeo, ésta se centra en los países del Este y puede llegar a alcanzar el millón de toneladas al año.

La EU, según la Regulación del Consejo 793/93<sup>6</sup>, divide los productos químicos en dos categorías, compuestos con alto volumen de producción (HVPC), los cuales son producidos o importados en cantidades superiores a las 1000 toneladas por año, y compuestos con bajo volumen de producción (LVPC), que se producen o importan en cantidades comprendidas entre 10 y 1000 toneladas al año. La lista de HVPC incluye 22 ftalatos, y 11 más se encuentran en la lista de LVPC.

El ftalato más usado es el DEHP (representa alrededor del 50% del consumo total europeo). El ftalato de di-isononilo (DINP) y de di-isodecilo (DIDP), que constituyen el 52% del consumo de ftalatos en Estados Unidos (US)<sup>7</sup>, representa más del 85% de la producción europea<sup>8</sup>.

Los ftalatos de alto peso molecular, gracias a sus propiedades (alta solubilidad en materiales poliméricos, estabilidad, fluidez y baja volatilidad), se emplean como plastificantes no reactivos en la fabricación de distintos materiales, aportándoles mayor flexibilidad y maleabilidad.

Su principal aplicación es en la producción del policloruro de vinilo (PVC), aunque también se emplean en otros materiales como resinas epoxi, poliéster, gomas sintéticas, naturales y cloradas, polisulfito, nitrocelulosa, etilcelulosa y poliuretano. En estas aplicaciones, la cantidad de ftalatos, puede llegar a representar entre un 5 y un 60% del peso total del plástico o la resina. El destino final de estos materiales cubre un amplio espectro de productos, incluyendo juguetes, ropa de lluvia, cortinas de ducha, envoltorios plásticos en productos alimenticios, alfombras, recubrimientos de paredes y suelos, zapatos, cableado, material médico (bolsas de transfusión), automóviles y tapicerías.

Además de estas aplicaciones, los ftalatos también se usan en la producción de lubricantes y cosméticos (fragancias, lacas, esmalte para uñas, desodorantes), como aditivos en industrias textiles, como componentes de fluidos dieléctricos o en la formulación de pesticidas<sup>9-12</sup>.

### **II.2.1.3. COMPORTAMIENTO EN EL MEDIO AMBIENTE**

La liberación de los ftalatos al medio natural puede ocurrir durante su producción o durante la manufacturación de los materiales plásticos. Como no están químicamente unidos a la matriz polimérica de estos materiales, también pueden llegar al medioambiente por migración o volatilización desde los productos finales durante su uso, o por lixiviación e incineración una vez que estos productos son desechados<sup>13-18</sup>.

Debido a esta movilidad desde los productos comerciales, su gran volumen de consumo y el amplio espectro de aplicaciones, los ftalatos se encuentran distribuidos en los diferentes medios de la biosfera y se consideran contaminantes ubicuos<sup>19-22</sup>.

Los ftalatos están presentes en el aire, tanto en fase vapor, como asociados a las partículas atmosféricas, a un nivel de concentración bajo ( $\text{ng}/\text{m}^3$ ), aunque la concentración en ambientes interiores puede llegar a ser hasta varios órdenes de magnitud mayor<sup>9</sup>. Muchos materiales de construcción contienen cantidades importantes de ftalatos y la inhalación de estos compuestos puede constituir una de las principales fuentes de exposición en humanos.

Por otra parte, la difusión a través del aire es el principal medio de distribución de los ftalatos en el medioambiente, a pesar de sus bajas presiones de vapor. Su detección en la superficie de nieve y en la capa de hielo de la Antártida, confirma que pueden ser transportados a través de distancias largas sin sufrir deposición o degradación<sup>23</sup>. Se supone que la principal ruta de degradación en la atmósfera es la fotodegradación, y el tiempo de vida medio para la mayoría de los ftalatos es inferior a un día<sup>17</sup>.

La presencia de ftalatos en el medio acuático se debe a puntos de entrada, como los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual, las industrias que utilizan estos compuestos o los vertederos de desechos plástico, todas fuentes de origen antropogénico.

En la **Tabla II.2.1.3** se recogen los niveles encontrados en aguas superficiales y residuales para los seis ftalatos incluidos en este trabajo, publicados en estudios recientes<sup>24-29</sup>.

**Tabla II.2.1.3.** Concentraciones (en  $\text{ng}/\text{mL}$ ) de los seis ftalatos estudiados encontradas en distintas muestras de agua.

Muestra	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DOP	Año	Referencia
Agua de mar	0.03-351	0.03-398	1.0-1028		0.06-2307		2002	24
Agua de mar	1.6-2.1	1.4-1.8	1.3-1.9	0.5-1.1	2.1-3.2	0.8-1.5	2001	25
Agua de río	0.03-19.4	0.03-35.6	0.04-75.6		4.6-90.5		2002	24
Agua de río		0.6	0.4		1.1		2001	25
Agua de manantial	0.1	0.04	0.02	0.002	2.88	nd	2002	26
Agua de escorrentías	nd	2-33	1-23	2-7	3-460		2003	27
Agua residual		nq	2.2	0.2	3.8	3.4	2003	28
Agua residual					1.38		2002	29

Las concentraciones encontradas son bastante altas, en concreto, para DEHP y para DBP.

Esto nos da una idea de la importancia de controlar los niveles de contaminantes en las EDARs, ya que pueden convertirse en importantes fuentes de contaminación de las aguas superficiales, así como, estudiar los fenómenos que se producen durante la depuración.

Los ftalatos tienden a acumularse en los lodos de las plantas de tratamiento de agua residual, por lo que éstas son importantes para la degradación de estos compuestos e impedir que lleguen al medio acuático. Las concentraciones encontradas están entre 10-100 mg/kg peso seco (ps)<sup>30</sup>, siendo el DEHP el ftalato presente en mayor concentración.

El uso de los lodos de depuradora como fertilizantes agrícolas podría conducir a la contaminación de los suelos y a una exposición, directa o a través de la cadena alimenticia, de los seres humanos<sup>31</sup>. En este sentido, la EU ha establecido límites de concentración para algunos contaminantes orgánicos, incluyendo al DEHP, para la mejora de la calidad de los lodos usados con fines agrícolas<sup>32</sup>.

En base a los valores de log  $K_{ow}$  (ver **Tabla II.2.1.1.2**), se espera que los ftalatos tengan una movilidad limitada en los suelos.

La vida media por degradación aeróbica, tanto en suelos como en aguas naturales, tiende a aumentar a medida que aumenta la longitud de la cadena carbonada del compuesto. *Staples et al.*<sup>17</sup> estimaron que en aguas naturales se encontraba entre menos de 1 día y 2 semanas, y en sedimentos del orden de varios meses.

Existen varias publicaciones que confirman la presencia de ftalatos en biota, incluyendo, plantas, peces, ratas y vacas, que confirman la asimilación de los compuestos disponibles en el medio por los organismos vivos; así como, en muestras biológicas humanas. Sin embargo, los ftalatos se metabolizan rápidamente a sus correspondientes alcoholes monoésteres y posteriormente, mediante oxidación y conjugación, a otros metabolitos que se excretan a través de la orina<sup>9,17</sup>.

En algunos estudios ecotoxicológicos, se ha demostrado que los monoésteres pueden ser tóxicos en mamíferos, y su presencia, junto con otros productos de degradación, como el ácido ftálico, se ha confirmado en distintas muestras de agua, incluyendo agua de río y de escorrentía<sup>27,33</sup>; por tanto, también deben ser considerados a la hora de evaluar los riesgos ambientales de los ftalatos.

En los organismos superiores, este proceso de metabolización se produce con mayor rapidez, por lo que, no se va a producir biomagnificación a través de la cadena alimenticia<sup>34</sup>.

#### II.2.1.4. TOXICOLOGÍA

Actualmente todavía no se conocen en profundidad los posibles efectos de los ftalatos en el ambiente y en la salud humana<sup>17</sup>, aunque, en los últimos años, se han publicado estudios que parecen indicar que algunos ftalatos pueden causar alteraciones en ciertos organismos<sup>13,35-38</sup>.

Los primeros estudios sobre los efectos carcinogénicos de los ftalatos con animales de laboratorio, pusieron de manifiesto que dosis elevadas provocaban la aparición de tumores en el hígado. Al realizar el mismo estudio en primates, los resultados fueron negativos, por lo que, en principio, podría considerarse que la especie humana es poco sensible al efecto carcinógeno de los ftalatos<sup>39</sup>. No obstante, es arriesgado extrapolar los resultados de la experimentación animal a la especie humana.

Basándose en los estudios con animales de laboratorio, la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de US, clasificó al DEHP y al BBP como sustancias, probablemente cancerígenas (grupo B2) y posiblemente cancerígenas (grupo C) en humanos, respectivamente. La EPA también tiene clasificados otros compuestos, como el DBP y el DEP, dentro del grupo D (inadecuada o no evidente carcinogenia en humanos y animales). Por otra parte, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cancer (IARC)<sup>40</sup>, aunque en una evaluación inicial consideró al DEHP como posible carcinógeno, en una evaluación más reciente (2000), lo clasificó en el grupo 3 (no clasificable por su carcinogenia en humanos) junto al BBP<sup>41</sup>.

En cuanto a los efectos sobre la reproducción, en estudios con animales se han encontrado alteraciones en la capacidad reproductiva, como atrofas en el sistema reproductor o descenso en los niveles de testosterona, al administrárseles dosis elevadas de ftalatos<sup>42</sup>.

También se han realizado diferentes investigaciones sobre los efectos en el sistema endocrino. En los estudios *in vitro*, el DBP, el BBP y el DEHP, dan un resultado positivo, pudiendo considerarse como estrógenos débiles<sup>35</sup>, mientras que para la mayoría de las experiencias *in vivo* los resultados dan negativos<sup>43,44</sup>. En este sentido, hasta 12 ftalatos, incluyendo los tres anteriores, están dentro de la lista de las sustancias sospechosas de producir alteraciones en el sistema endocrino publicada por la UE<sup>45</sup>.

Por otro parte, diversas organizaciones internacionales, como la Agencia Estadounidense para el Control de las Sustancias Tóxicas y Enfermedades relacionadas (ASTDR)<sup>9-12</sup>, la Organización Mundial de la Salud (WHO)<sup>46-49</sup>, el Departamento de Salud y Servicios Humanos estadounidense (DHHS)<sup>50-56</sup> y la EU<sup>57-59</sup>, han realizado evaluaciones del riesgo asociado a la salud humana para algunos ftalatos de los mencionados anteriormente.

### II.2.1.5. LEGISLACIÓN

Los efectos adversos para la salud que presentan ciertos ftalatos, descritos en el apartado anterior, han provocado que la EU prohíba el uso de DBP, BBP, DEHP, DOP, DINP y DIDP en materiales plásticos para la fabricación de juguetes de bebé, ya que al introducir los juguetes en la boca, se pueden liberar estos aditivos disolviéndose en la saliva<sup>60</sup>. También se han propuesto diversas prohibiciones al uso de DEHP en material médico.

En cuanto a los vertidos en el medio acuático, en 1998, la Convención para la Protección del Medioambiente Marino del Noroeste Atlántico propuso el objetivo de eliminar las emisiones de todas las sustancias peligrosas para el medioambiente para el año 2020, incluyendo al DBP y el DEHP en la lista de compuestos químicos para la acción prioritaria<sup>61</sup>. El DEHP también ha sido incluido en la llamada lista de sustancias prioritarias de la Directiva 2000/60/CE de la UE<sup>62</sup>. De acuerdo con la sección 307 de la Agencia Estadounidense para la Calidad del Agua (US Clean Water Act), los ftalatos, DEP, DMP, DEHP, BBP, DBP y DOP, deberían ser considerados contaminantes tóxicos prioritarios<sup>63</sup>.

Como complemento a estas políticas, se han establecido unos niveles de concentraciones máximas permitidas en los distintos compartimentos medioambientales.

A nivel internacional, la WHO ha establecido un valor límite de 8 µg/L para DEHP en aguas superficiales y de bebida<sup>64</sup>, que es próximo al nivel máximo admisible de contaminante (MCL) para este compuesto, establecido por la EPA (6 µg/L)<sup>65</sup>, aunque el objetivo debería ser la eliminación completa<sup>66</sup>.

A nivel europeo, el Instituto Nacional Holandés de Salud Pública y Medioambiental (The Netherlands National Institute of Public Health and Environment) ha propuesto como niveles de riesgo ambiental (NRAs) en agua, 10 y 0.19 µg/L para DBP y para el DEHP, respectivamente. Estos niveles también se consideran como los valores NOEC en el medio acuático. Más recientemente, la Directiva comunitaria 2006/0129 (COD) establece como norma de calidad ambiental (NCA) el límite de 1.3 ng/mL de concentración media anual para en DEHP en aguas superficiales<sup>67</sup>.

Respecto a la liberación de estos contaminantes a la atmósfera, en US, tres ftalatos (DMP, DBP and DEHP) se han incluido en la lista de contaminantes atmosféricos peligrosos emitida por la Agencia estadounidense de Calidad del Aire (US Clean Air Act)<sup>68</sup>. Además, la Administración estadounidense para la Salud y Seguridad Laboral (US Occupational Safety and Health Administration, OSHA), establece como límite de exposición medio (Time Weight Average, TWA), 5 mg/m<sup>3</sup> para estos ftalatos<sup>69</sup>.



## II.2.2. ANÁLISIS EN MUESTRAS DE AGUA

### II.2.2.1. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA

#### II.2.2.1.1. Blancos de agua

Uno de los problemas más importantes en el análisis de ftalatos en muestras de agua, es la detección de estos compuestos en las muestras usadas como blancos<sup>2,21,26,27,33,70-73</sup>. Los ftalatos se han detectado en todos los tipos de agua purificada que normalmente se utilizan en el laboratorio, como el agua destilada, el agua Milli-Q y aguas comerciales especiales para la determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)<sup>33</sup>. En la **Tabla II.2.2.1.1** se recogen las concentraciones encontradas en este tipo de aguas en algunos estudios.

**Tabla II.2.2.1.1** Concentraciones (en µg/L) de los ftalatos detectados en muestras de agua de uso común en el laboratorio.

Tipo de agua	Ref.	Método	Concentración (µg/L)				
			DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP
Desionizada	26	SPME-GC-ECD	nd	0.04	0.15	0.005	0.49
Destilada	21	HPLC-GC-MS			0.005		0.002
Destilada	33	LLE-GC-FID	0.10	0.06	1.24		4.21
Milli-Q	72	On-line SPE-GC-MS			0.5	0.02	0.5
Purificada	27	LLE-GC-MS	<0.01	0.29	1.58	0.02	1.06
Redestilada	33	LLE-GC-FID	nd	0.14	3.28		0.93
Comercial para VOCs	33	LLE-GC-FID	nd	nd	10.58		nd

#### II.2.2.1.2. Conservación y pretratamiento de las muestras

Las muestras para la determinación de ftalatos pueden conservarse manteniendo la temperatura a 4°C, tanto a pH natural como a pH ácido, aunque el período de almacenamiento no debería prolongarse más de cuatro días, por lo problemas de biodegradación que puedan sufrir. También se recomienda la adición de 500 mg de azida sódica por cada litro de muestra para la preservación química de los compuestos<sup>30,74</sup>.

No se recomienda la conservación de muestras a pH básico<sup>17</sup>, ya que incluso refrigeradas, se ha comprobado que la mayoría de los compuestos sufren una disminución de hasta el 50%, después de 7 días de almacenamiento<sup>75</sup>.

Antes de la extracción, algunas muestras deben filtrarse, sobre todo aquellas que contienen un alto nivel de partículas sólidas en suspensión.

#### **II.2.2.1.3. Extracción**

Los procedimientos de extracción y preconcentración de ftalatos más usados con muestras de agua, son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE), de hecho ambas técnicas han sido propuestas en métodos oficiales (ver **Tabla II.2.2.3**). Además, en los últimos años, otra técnica relativamente nueva, la microextracción en fase sólida (SPME), está adquiriendo importancia en el análisis de estos compuestos.

##### **II.2.2.1.3.1 Extracción líquido-líquido (LLE)**

En la mayoría de las aplicaciones de la LLE para la determinación de ftalatos, las extracciones son realizadas en discontinuo con embudos de decantación y se emplean volúmenes de muestra grandes (entre 0.1 y 5 L)<sup>27,33,74-79</sup>.

A menudo, las muestras se acidifican y se adiciona cloruro sódico para aumentar la eficacia de extracción. Los disolventes, diclorometano y hexano, son los más usados. Una vez obtenido el extracto, se eliminan los restos de agua que pueda contener con sulfato sódico anhídrido y finalmente se concentra. Los extractos se suelen inyectar sin ningún tipo de limpieza.

Sin embargo, el nivel de concentración al que se puede aplicar, está limitado por la presencia de contaminación a niveles traza en los disolventes empleados, y límites de detección inferiores a 0.1 µg/L no son fiables empleando esta técnica<sup>30</sup>.

### II.2.2.1.3.2 Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE se ha aplicado a la determinación de ftalatos en diferentes tipos de muestras acuosas<sup>21,24,28,71-75,80-84</sup>. La ventaja que presenta esta técnica respecto a la LLE, es que se puede obtener un mayor nivel de concentración con el uso de muy poco o ningún disolvente, y por tanto, se evita la contaminación introducida por éste. Su limitación es el análisis de muestras con un alto contenido en sólidos o muy contaminadas<sup>30</sup>. Los materiales adsorbentes más usados son, C-18 y la fase polimérica basada en poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB). En un estudio reciente, se ha aplicado una nueva base polimérica, Oasis, aunque las recuperaciones obtenidas son más bajas que con C-18<sup>71</sup>.

La SPE se puede usar tanto en modo discontinuo (*off-line*), como en modo continuo (*on-line*).

En la SPE *off-line*, se emplean grandes volúmenes de muestra (entre 250 y 1000 mL). Para mejorar la eficacia de extracción, normalmente se añade una cierta cantidad de disolvente orgánico (metanol o acetonitrilo, miscibles con la agua) a la muestra. La mayoría de los cartuchos empleados son de polietileno o de polipropileno, por tanto existe un potencial nivel de contaminación de ftalatos. En estos casos, es más conveniente el uso de tubos de vidrio para elaborar el cartucho. Antes de la elución, los cartuchos se suelen secar con corriente de nitrógeno. Los disolventes empleados para eluir los ftalatos del cartucho son disolventes orgánicos, como el etilacetato, metanol, acetonitrilo o mezclas de disolventes. El eluato obtenido se concentra y, normalmente, se analiza sin ningún otro tratamiento, aunque, en el caso de muestras muy contaminadas se puede incluir un paso de limpieza con alúmina activada<sup>74,75</sup>.

Una alternativa al uso de cartucho de SPE, son las membranas o discos<sup>75,83</sup>. La ventaja que presentan las membranas, es que el flujo de muestro es mayor, y por tanto, se puede procesar más rápido un mayor volumen de muestra. Esta técnica ya ha sido aplicada al análisis de ftalatos en agua<sup>75</sup>, y se ha incluido como opción en el método oficial de la EPA 8061 (ver **Tabla II.2.2.3**).

En el caso de la SPE-*on line*, la muestra se bombea a través de una pre-columna rellena de pequeñas partículas (15-25 µm) de C-18<sup>21</sup> o PS-DVB<sup>72,73</sup> como medio adsorbente. Se han desarrollado diferentes interfases con este propósito. Por ejemplo, *Hyötyläinen et al.*<sup>21</sup>, han desarrollado una interfase que consiste en una cámara de vaporización donde se encuentra la precolumna y el disolvente se inyecta directamente en split en estado gaseoso. *Brossa et al.*<sup>72</sup> incluyeron seis ftalatos en la determinación de diferentes disruptores endocrinos y desarrollaron un método automático SPE-GC-MS. La interfase es un vaporizador de temperatura programada (PTV) cuyo *liner* o inserto esta relleno con Tenax.

La combinación de la SPE con GC-MS es una de las alternativas más comunes para este tipo de análisis y algunos métodos oficiales se basan en esta combinación (**Tabla II.2.2.3**).

#### II.2.2.1.3.3. Microextracción en fase sólida (SPME)

Existen diversas aplicaciones de la SPME al análisis de ftalatos en muestras de agua<sup>2,25,26,29,70,85-87</sup>. Supone una alternativa muy interesante ya que se reduce el riesgo de contaminación durante el tratamiento de muestra. Además, al ser una técnica que no necesita el uso de disolventes orgánicos, se pueden reducir los niveles de contaminación de fondo y obtener mejores LODs. El principal problema que presenta son los niveles de contaminación encontrados en el agua purificada empleada (ver **Tabla II.2.2.1.1**), en concreto, para DBP y DEHP. La mayoría de los autores lo que hacen es tener en cuenta el nivel de los blancos en su calibrado y en la estimación de los LODs.

Una de las primeras aplicaciones de la SPME fue el desarrollo de un método para la determinación de DEP en agua, empleando LC-UV para el análisis<sup>87</sup>. En el desarrollo, se optimizaron diferentes parámetros de la SPME, como el tipo de fibra. CW-TRP y PDMS-DVB fueron las fibras con las que se obtuvieron mejores resultados. El método propuesto consistió en el muestreo directo de las muestras a temperatura ambiente con adición al 25% (peso/volumen) de cloruro sódico. Se comprobó el rango lineal entre 5 y 50 ng/mL con un LOD de 1 ng/mL.

La SPME acoplada a la LC también se aplicó en la determinación de DPP, DIBP y DCHP usando en este caso la fibra CW-DVB en el modo de desorción dinámica<sup>84</sup>. En este caso, se obtuvieron LODs entre 4 y 9.5 ng/mL.

Con la técnica SPME acoplada a GC-MS, se pueden obtener LODs más bajos (del orden de ng/L). *Peñalver et al.*<sup>25,86</sup> estudiaron la SPME de seis ftalatos en agua. En el primer estudio, desarrollaron un método basado en la fibra de PA, mientras que el segundo, compararon las respuestas obtenidas con cinco fibras comerciales (PDMS, PDMS-DVB, PA y CW-DVB). Las condiciones finales de extracción a las que llegaron fueron: fibra de PDMS-DVB, temperatura de extracción 80°C, 30 min de extracción y desorción a 250°C (de 3 a 5 min).

*Luks-Betlej et al.*<sup>2</sup> también estudiaron la extracción de los ftalatos usando diferentes fibras comerciales (100 y 7 µm PDMS, PDMS-DVB (StableFlex), PA, CW-DVB (StableFlex), DVB-Carboxen-PDMS (StableFlex). Las que proporcionaron mayores eficacias de extracción, fueron las fibras con fase DVB. En cuanto a la repetibilidad, la fibra de CW-DVB es la recomendada por estos autores. El método propuesto, consistió en la extracción a 25°C

durante 60 min y desorción a 270°C (5 min). En estos estudios, se detectaron algunos analitos en los blancos, por lo que, las respuestas obtenidas en ellos, se consideraron en el establecimiento de los LODs.

Recientemente, se ha publicado un método de cribado para el análisis de 16 PAHs, 6 PCBs y 6 ftalatos, utilizando un diseño experimental (multisimplex) para la optimización de la SPME<sup>70</sup>. Debido a los problemas de contaminación, los LOD para algunos ftalatos, como el DEHP (3.15 µg/L), fueron bastante altos.

Los ftalatos también se han determinado por SPME-GC usando un detector de captura electrónica (ECD)<sup>26</sup>.

En los últimos años, también se han desarrollado otras técnicas miniaturizadas de preparación de muestra, como la microextracción en fase líquida (LPME)<sup>88</sup>, la cual presenta resultados comparables a la SPME para el análisis de ftalatos en agua. Otra técnica similar, está basada en el uso de fibras poliméricas sintéticas compuestas por cientos de microfibrillas<sup>29</sup>. Este sistema se acopló *on-line* con un micro-LC, instalándolo como un bucle en la válvula de inyección, lo que permitió no sólo minimizar el consumo de disolvente sino mejorar los LOQs al mejorar las eficacias de extracción.

## II.2.2.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

Aunque se han publicado algunas aplicaciones de técnicas electroforéticas para la separación de ftalatos<sup>88,89</sup>, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (LC) son las técnicas normalmente empleadas en el análisis de muestras acuosas.

Los ftalatos son suficientemente volátiles y estables térmicamente para poder analizarse por GC. Entre los detectores que se han acoplado a la GC, se encuentran el detector de infrarrojo (IR)<sup>25</sup> y el de captura electrónica (ECD)<sup>26,75,83</sup>. Este último está propuesto en los métodos de la EPA 606 y 8060 (ver **Tabla II.2.2.3**). El detector de ionización de llama (FID)<sup>24,33</sup>, también se aplicó al análisis de muestras ambientales, aunque hoy en día sólo se emplea para muestras que presenten una concentración alta de los compuestos (juguetes, plásticos).

En la actualidad, los métodos que se proponen, se basan en la técnica de GC con espectrometría de masas (MS) en el modo de ionización electrónica (EI)<sup>1,2,27,70-74,78,79,86,88</sup>. Los ftalatos fragmentan con iones característicos, tales como,  $m/z = 149$  (DEP, DBP, BBP, DEHP, DIBP),  $m/z = 163$  (DMP) y  $m/z = 293$  (DINP, DIDP), lo que permite, una detección muy sensible

y específica, en concreto cuando se trabaja en el modo de monitorización de un ión seleccionado (SIM). También se pueden aplicar el modo de ionización química negativa (NCI)<sup>77</sup> y la espectrometría de masas en tandem (MS-MS)<sup>77</sup>. En cuanto a los analizadores de masas, normalmente se utilizan los espectrómetros de baja resolución, y tanto el cuadrupolo como la trampa de iones, son las configuraciones empleadas como detectores.

Las columnas de separación normalmente presentan unas medidas comprendidas entre 25-30 m de longitud x 0.25-0.32 mm de diámetro interno, revestidas con fenilmetilpolisiloxano o dimetilpolisiloxano como fases estacionarias, las cuales permiten programar las separaciones con un rango de temperaturas muy amplio. Un programa típico iría de 50°C a 300°C con una rampa de 10°C/min, obteniendo una buena resolución con un tiempo de análisis relativamente corto. Sin embargo, no es posible la separación cromatográfica de todos los isómeros, por tanto, para separaciones complejas debe usarse detección selectiva de masas.

Además de los ftalatos, el análisis de sus metabolitos resulta de especial interés, sobre todo, el análisis de los monoésteres, teniendo en cuenta su potencial toxicidad. Los monoésteres presenta un grupo carboxílico, que normalmente se derivatiza para mejorar su análisis cromatográfico. Se han empleado diferentes reacciones de derivatización para este fin como la metil-esterificación<sup>33</sup> o la sililación<sup>27,82</sup>.

La LC también se ha utilizado en la determinación de ftalatos de muestras acuosas mediante absorción ultravioleta como sistema de detección (UV)<sup>29,33,76,84,85,87</sup>. En las aplicaciones más recientes, también se ha empleado la MS como técnica de detección<sup>28</sup>, aunque éstas se centran más en el análisis de muestras biológicas. Con esta técnica se han propuestos diversos métodos para la evaluación de la exposición de la población a los ftalatos mediante el análisis de sus metabolitos<sup>89-91</sup>. En general, la LC-MS es menos sensible que GC-MS, pero puede presentar una serie de ventajas respecto a esta, como una mayor selectividad, información respecto al peso molecular de mezclas isoméricas, procedimientos de limpieza más simples y tiempos de análisis más cortos<sup>30</sup>. Las columnas cromatográficas que se emplean suelen ser de fase reversa, y se han descrito métodos con ambos modos de elución, isocrático y en gradiente.

### **II.2.2.3. MÉTODOS OFICIALES**

La EPA ha publicado numerosos procedimientos analíticos enfocados a la determinación de ftalatos en distintos tipos de muestras acuosas, como los métodos 506<sup>94</sup> y 525<sup>95</sup> para su determinación en muestras de agua de bebida, los métodos 606<sup>96</sup>, 625<sup>97</sup> y

1625<sup>98</sup> en aguas residuales urbanas e industriales, y los métodos 8061<sup>99</sup>, 8270<sup>100</sup> y 8410<sup>101</sup> para aguas subterráneas y de escorrentía, además de suelos, lodos y sedimentos.

En la **Tabla II.2.2.3** se resume la información básica de estos procedimientos analíticos.

**Tabla II.2.2.3. Métodos propuestos por la EPA para el análisis de ftalatos en diferentes muestras de agua.**

Método (Tipo de muestra y compuestos)	Muestra, Conservación y Pretratamiento	Extracción	Limpieza	Método de detección
<b>EPA 506 1.1</b> (Agua de bebida DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP)	1L botellas cristal ámbar, ≤4°C, en ausencia de luz para la decoloración: 80 mg/L de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	LLE en embudo de decantación (3 x 60 mL DCM, 40 mL hexano)	Florisil y/o alúmina	GC-FID
		Discos de SPE C <sub>18</sub> (elusión: 5 mL acetonitrilo y 10 mL DCM)		
		Cartuchos de SPE C <sub>18</sub> (elusión: 10 mL de DCM)		
<b>EPA 525.2</b> (Agua de bebida DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP)	Igual que <b>EPA 506 1.1</b> , 40-50 mg/L de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ; pH < 2 (HCl) 5 mL/L muestra de MeOH	Cartuchos de SPE C <sub>18</sub> (5 mL EtAc y 5 mL DCM)	no	GC-MSD
		Discos de SPE C <sub>18</sub> (5 mL EtAc; 5 mL DCM y 3 mL EtAc:DCM (1:1))		
<b>EPA 606</b> (Agua residual urbana e industrial DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP)	1L botellas cristal ámbar, ≤4°C	LLE en embudo de decantación (3 x 60 mL de DCM)	Florisil y/o alúmina	PGC-ECD
<b>EPA 625</b> (Agua residual urbana e industrial DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP)	Igual que <b>EPA 506 1.1</b> , pH > 11 (NaOH)	LLE en embudo de decantación (3 x 60 mL de DCM, por 1 L de muestra)	no	PGC-MSD
		LLE en continuo (200-500 mL de DCM, 24 h)		
<b>EPA 1625.2</b> (Efuentes industriales y urbanos DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP)	Igual que <b>EPA 625</b> , pH > 12-13 (NaOH)	LLE en continuo (200-300 mL de DCM, 18-24 h)	no	GC-MSD
<b>EPA 8061A</b> (Aguas subterráneas y de escorrentía DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP, DBEP, DEEP, DMEP, DAMP, DCHP, DHP, DIHP, DIBP, DNP, HEHP)	4 x 1 L botellas cristal ámbar; ≤4°C; para la decoloración: 3 mL/gal 10% tiosulfato sódico, pH 5-7 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o NaOH)	LLE en embudo de decantación (EPA 3510C)(3 x 60 mL de DCM)	Alúmina; florisil	GC-ECD
		Disco de SPE de C <sub>18</sub> (5 mL acetona y 15 mL acetonitrilo).		
<b>EPA 8270D</b> (Aguas subterráneas y de escorrentía DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP)	Igual que <b>EPA 8061A</b> , pH < 2 (HCl), pH > 11 (NaOH)	LLE embudo de decantación (3 x 60 mL DCM)	Alúmina; florisil	GC-MS
		LLE en continuo (300-500 mL DCM (18-24h))		
	pH=5-7 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o NaOH)	Disco de SPE de C <sub>18</sub> (5 mL acetona, 15 mL acetonitrilo).		
<b>EPA 8410</b> (Aguas subterráneas y de escorrentía DMP, DEP, DPP, DBP, BBP, DEHP, DOP)	Igual que <b>EPA 8061A</b> , sin ajustar el pH	LLE embudo de decantación (3 x 60 mL DCM)	no	GC-FTIR
		LLE en continuo(300-500 mL DCM (18-24h))		

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) J. Berset, R. Etter-Holzer, J. of AOAC International 84 (2) (2001) 383.
- (2) K. Luks-Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, J. Chromatogr. A 938 (2001) 93.
- (3) I.T. Cousin, D. Mackay, Chemosphere 41(2000) 1389.
- (4) I.T. Cousin, D. Mackay, T.F. Parkerton. Physical-chemical properties and evaluative fate modelling of phthalate esters. In: CA Staples, ed. The handbook of environmental chemistry. Vol 3, Part Q. Phthalate Esters, pp 57-84, Berlin: Springer-Verlag, 2003.
- (5) Z.P. Lin, M.G. Ikonou, H. Jing, C. Mackintosh, F.A.P.C. Gobas, Environ Sci Technol 37 (2003) 2100.
- (6) The Council of the European Communities. Council Regulation (EEC) 793/93 of 23 March 1993 on the Evaluation and Control of the Risks of Existing Substances. Official Journal L 084, 05-04-1993, pp 0001-0075.
- (7) M.K. Stanley, K.A. Robillard, C.A. Staples. Introduction. In: CA Staples, ed. The handbook of environmental chemistry. Vol 3, Part Q. Phthalate Esters, pp 1-7, Berlin: Springer-Verlag, 2003.
- (8) PricewaterhouseCoopers. Eco-profile of High Volume Commodity Phthalate esters (DEHP/DINP/DIDP). European Council for Plasticizers and Intermediates (ECPI). January 2001.
- (9) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for di-(2-ethylhexyl) phthalate. US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, 2002.
- (10) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for diethyl phthalate. US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, 1995.
- (11) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for di-n-butyl phthalate. US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, 2001.
- (12) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for di-n-octyl phthalate. US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, 1997.
- (13) M. Castillo, D. Barceló. Trends Anal. Chem., 16 (1997) 574.



- (14) M.C. Yin, K.H. Su. *J. Food Drug Anal.* 4 (1996) 313.
- (15) D.J. Russel, B.M. Duffie, *Chemosphere* 15 (8) (1996) 1003.
- (16) T.J. Wams, *Sci. Total Environ.* 66 (1987) 1.
- (17) C.A. Staples, D.R. Peterson, T.F. Parkerton, W.J. Adams, *Chemosphere* 35 (1997) 667.
- (18) K. Holadová, J. Hajslová. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 59 (1995) 43.
- (19) M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló. *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2180.
- (20) M. Möder, P. Popp, J. Pawliszyn, *J. Microcol. Sep.* 10 (1997) 875.
- (21) T. Hyötyläinen, K. Grob, M. Biedermann, M.L. Riekkola, *J. High Resol. Chromatogr.* 20 (1997) 410.
- (22) H.R. Rogers. *Sci. Total Environ.* 185 (1996) 3.
- (23) P. Desideri, L. Lepri, L. Checchini, D. Santianni, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 55 (1994) 33.
- (24) O.S. Fatoki, A. Noma, *Water, Air and Soil Pollut* 140 (2002) 85.
- (25) A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 377.
- (26) G. Prokupková, K. Holadová, J. Poustka, J. Hajslová, *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 211.
- (27) S. Jonsson, J. Ejlersson, A. Ledin, I. Mersowsky, B.H. Svensson, *Water Res.* 37 (2003) 609.
- (28) R.A. Gimeno, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* 58 (2003) 37.
- (29) Y. Saito, M. Nojiri, M. Imaizumi, Y. Nakao, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 105.
- (30) F. David, P. Sandra, B. Tienpont, F. Vanwalleghem. Analytical methods review. In: CA Staples, ed. *The handbook of environmental chemistry. Vol 3, Part Q. Phthalate Esters.* Berlin: Springer-Verlag, 2003.
- (31) J. Vikesø, M. Thomsen, L. Carlsen, *Sci. Total Environ.* 296 (2002) 105.
- (32) A.M. Feuille. Association Française de Normalization, *Sewage Sludge Management, Revision of Directive 86/278/CE*, 1-14, 1999.
- (33) K. Hashizume, J. Nanya, C. Toda, T. Yasui, H. Nagano, N. Kojima, *Biol. Pharm. Bull.* 25

(2002) 209.

(34) I. Cousins, D. Mackay. Review of EUSES modelling for di-2 ethylhexyl phthalate (DEHP). Final Report. CEMC Report No. 200101. European Chemical Industry Council (CEFIC). 2001.

(35) S. Jobling, T. Reynolds, R. White, M.G. Parker, J.P. Sumpter, Environ. Health Persp. 103 (6) (1995) 582.

(36) P.T.C. Harrison, P. Holmes, C.D.N. Humfrey, Sci. Total Environ 205 (1997) 97.

(37) D. Roy, M. Palangal, Ch.W. Chen, R.D. Thomas, J. Colerangle, A. Atkinson, Z.J. Yan, J. Toxicol. Environ. Health 50 (1997) 1.

(38) C.A. Harris, P. Henttu, M.G. Parker, J.P. Sumpter. Environ. Health Perspect. 105, 803 (1997).

(39) C.N.A. Palmer, M. Hsu, K.J. Griffin, J.L. Raucy, E.F. Johnson, Molecular Pharmacology 53 (1998) 14.

(40) International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some industrial chemicals. Vol 77. World Health Organization, 2000, pp 41.

(41) International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some chemicals that cause tumors of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. Volume 73. World Health Organization, 1999, pp 115.

(42) F.M. Sullivan, W.J. Watkins, M.T. van der Venne. The Toxicology of Chemicals, Series Two: Reproductive Toxicity, Volume 1, Summary Reviews of the Scientific Evidence, Commission of the European Communities (1993).

(43) A.M. Brady, G.J. Moffat, M.A. Martens, The Toxicologist 42 (1998) 176.

(44) T.R. Zacharewski, M.D. Meek, J.H. Clemons, Z.F. Wu, M.R. Fielden, J.B. Matthews. Toxicol. Sci. 46 (1998) 292.

(45) Comisión de las Comunidades Europeas. Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo: Aplicación de la Estrategia Comunitaria en Materia de Alteradores Endocrinos- Sustancias de las que se Sospecha Interfieren en los Sistemas Hormonales de Seres Humanos y Animales, COM (1999) 706. COM (2001) 262 final. Bruselas, 2001.

(46) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 189: di-

n-butyl phthalate. World Health Organization, Ginebra, 1997.

(47) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Concise International Chemical Assessment Document 52: diethyl phthalate. World Health Organization. Geneva, 2003.

(48) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 131: diethylhexyl phthalate. World Health Organization. Ginebra, 1992.

(49) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Concise International Chemical Assessment Document 17: butyl benzyl phthalate. World Health Organization. Ginebra, 1997.

(50) National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of di-n-butyl phthalate (DBP). US Department of Health and Human Service, 2003.

(51) National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of butyl benzyl phthalate (BBP). US Department of Health and Human Service, 2003.

(52) National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of di-n-hexyl phthalate (DnHP). US Department of Health and Human Service, 2003.

(53) National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR). Expert Panel Report on di(2-ethylhexyl)phthalate. US Department of Health and Human Service, 2000.

(54) National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of di-n-octyl phthalate (DNOP). US Department of Health and Human Service, 2003.

(55) National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of di-isononylphthalate (DINP). US Department of Health and Human Service, 2003.

(56) National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and

Developmental Effects of di-isodecylphthalate (DIDP). US Department of Health and Human Service, 2003.

(57) European Commission. European Union Risk Assessment Report. 1st Priority List. Vol 29. Dibutyl phthalate. Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection. European Chemicals Bureau (ECB). Office for Official Publications of the European Communities, 2003.

(58) European Commission. European Union risk assessment report. 2nd Priority List. Vol 35. 1,2-benzenedicarboxylic acid, di-C8-10-branched alkyl esters, C9-rich and di-"isononyl" phthalate (DINP). Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection. European Chemicals Bureau (ECB). Office for Official Publications of the European Communities, 2003.

(59) European Commission. European Union risk assessment report. 2nd Priority List. Vol 36. 1,2-benzenedicarboxylic acid, di-C9-11-branched alkyl esters, C10-rich and di-"isodecyl" phthalate (DIDP). Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection. European Chemicals Bureau (ECB). Office for Official Publications of the European Communities, 2003.

(60) European Union Commission. Decision 2003/113/EC amending Decision 1999/815/EC concerning measures prohibiting the placing on the market of toys and childcare articles intended to be placed in the mouth by children under three years of age made of soft PVC containing certain phthalates. Official Journal of the European Communities L 46, 20-2-2003, pp 27-28.

(61) OSPAR Commission. OSPAR list of chemicals for priority action. OSPAR convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic. Meeting of the OSPAR Commission. Summary Record OSPAR 2002 OSPAR 02/21/1-E, Annex 5. Amsterdam: 24-28 Junio 2002.

(62) European Union Commission. Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. Official Journal of the European Communities. L 331, 15-12-2001, pp 1-4.

(63) US Environmental Protection Agency. Introduction to water policy standards. Office of Water, 1999.

(64) World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality. 3rd edition (Draft). Chapter 8: Chemical Aspects. World Health Organization. 2003. pp 254.

- (65) US Environmental Protection Agency (EPA). National primary drinking water regulations: maximum contaminant levels for organic contaminants. US Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations 40 CFR 141.61. 2002. pp. 426-428.
- (66) US Environmental Protection Agency (EPA). National primary drinking water regulations: Maximum contaminant level goals for organic contaminants. Code of Federal Regulations 40 CFR 141.50. 2002, pp 424-425
- (67) Comisión de las Comunidades Europeas. Propuesta 2006/0129 (COD) de la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Bruselas, 17-7-2006.
- (68) US Code. Clean Air Act. Section 112. Hazardous air pollutants. 42 USC 7412, 1990.
- (69) US Occupational Safety and Health Administration (OSHA). OSHA general industry standards. Toxic and hazardous substances. Air contaminants. Code of Federal Regulations 29 CFR 1910.1000.
- (70) E. Cortazar, O. Zuloaga, J. Sanz, J.C. Raposo, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J. Chromatogr. A 978 (2002) 165.
- (71) N. Casajuana, S. Lacorte, Chromatographia 57 (2003) 649.
- (72) L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, J. Chromatogr. A: 998 (2003) 41.
- (73) L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 963 (2002) 287.
- (74) K. Furtmann, Fresenius J. Anal. Chem. 348 (1994) 291.
- (75) V. López-Avila, J. Milanes, J. AOAC 74 (1991) 793.
- (76) J.K. Ruminski, B. Dejewski, J. Wojtanis. Environmental Research. Part I. Investigation on diethyl phthalate (DEHP) pollution in soil and surface water near Wabrzezno (Torun district). Polish J of Environ Studies 4:65-69, 1995.
- (77) W.C. Brumley, E.M. Shafter, P.E. Tillander, J. AOAC Int. 77 (1994) 12308.
- (78) R.J. Law, T.W. Fileman, P. Matthiessen, Wat. Sci. Tech. 24 (1991) 127.
- (79) O.S. Fatoki, F. Vernon, Sci. Total Environ. 95 (1990) 227.
- (80) A.M. Casas-Hernández, M.P. Aguilar-Caballeros, A. Gómez-Hens, Anal. Lett. 36 (2003)

1017.

(81) Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, *Anal. Sci.* 19 (2003) 1491.

(82) S. Jonsson, H. Borén, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 393.

(83) I. Loureiro, I.M.R. de Andrade Brüning, I. Moreira. Phthalate contamination in potable waters of Rio de Janeiro City. *Progress in water resources*, 3(Water Pollution VI): 347-355, 2001.

(84) S. Jara, C. Lysebo, T. Greibrokk, E. Lundanes. *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 165.

(85) Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, *Anal. Lett.* 36 (2003) 389.

(86) A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé. *J Chromatogr A* 872 (2000) 191.

(87) M.T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 177.

(88) E. Psillakis, N. Kalogeranis, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 145.

(89) C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.* 542 (1991) 473.

(90) S. Takeda, S. Wakira, M. Yamade, A. Kawahara, K. Higashi, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2489.

(91) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 527.

(92) H.M. Koch, B. Rossbach, H. Drexler, J. Angerer, *Environ Research* 93 (2003) 177.

(93) B.C. Blound, K.E. Milgram, M.J. Silva, N.A. Malek, J.A. Reidy, L.L. Needham, J.W. Brock. *Anal. Chem.* 72 (2000) 4127.

(94) J.W. Munch, ed. Method 506: Determination of phthalate and adipate esters in drinking water by liquid-liquid extraction or liquid-solid extraction and gas chromatography with photoionization detection. Revision 1.1. National Exposure Research Laboratory. Office of Research and Development. US Environmental Protection Agency (EPA). Cincinnati, 1995.

(95) J.W. Munch, ed. Method 525.2: Determination of organic compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry. Revision 2.0. National Exposure Research Laboratory. Office of Research and Development. US Environmental Protection Agency (EPA). Cincinnati, 1995.

(96) US Environmental Protection Agency (EPA). Methods for organic chemical analysis of

municipal and industrial wastewater. Method 606-Phthalate ester. Code of Federal Regulations 40 CFR 141.136. Appendix A, 2001, pp 89-99.

(97) US Environmental Protection Agency (EPA). Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater method 625: base/neutrals and acids. Code of Federal Regulations 40 CFR 141.136. Appendix A, 2001, pp 200-229.

(98) US Environmental Protection Agency (EPA). Method 1625 revision B. Semivolatile organic compounds by isotope dilution gc/ms. Code of Federal Regulations 40 CFR 141.136. Appendix A, 2002, pp 287-310.

(99) US Environmental Protection Agency (EPA). Method 8061A. Phthalate esters by gas chromatography with electron capture detection (gc/ecd). Revision1. In: On-line Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods (SW-846). Office of Solid Waste. 1996.

(100) US Environmental Protection Agency (EPA). Method 8270D. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Revision 4. In: On-line Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods (SW-846). Office of Solid Waste, 1998.

(101) US Environmental Protection Agency (EPA). Method 8410. Gas chromatography/fourier transform infrared (GC/FT-IR) spectrometry for semivolatile organics: capillary column. Revision 0. In: On-line Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods (SW-846). Office of Solid Waste, 1994.





## II.3. COMPUESTOS IGNÍFUGOS BROMADOS (BFRs)

### II.3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

#### II.3.1.1. DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Los compuestos ignífugos bromados o “retardantes de llama bromados” (*Brominated Flame Retardants, BFRs*) pueden definirse como un grupo muy diverso de compuestos orgánicos, en los que uno o más átomos de hidrógeno son reemplazados por bromo. Contienen entre un 50 y un 95% en peso de bromo, y pueden clasificarse estructuralmente en compuestos aromáticos, alifáticos y cicloalifáticos<sup>1-5</sup>.

Se adicionan a plásticos y polímeros sintéticos, utilizados en variedad de productos de consumo, con objeto de reducir su inflamabilidad e inhibir su probabilidad de ignición<sup>4,5</sup>. Sus aplicaciones son muy diversas, por su gran eficacia como ignífugos y su bajo coste, entre las que se encuentran, el uso en equipos eléctricos y electrónicos, materiales aislantes, carcasas de ordenadores, televisores, productos de tipo textil y materiales de construcción<sup>6-9</sup>.

Existen más de 75 compuestos diferentes que pertenecen al grupo de los BFRs, entre los que se encuentran, los difenil éteres polibromados (PBDEs), los bifenilos polibromados (PBBs), el hexabromociclododecano (HBCD) y el 3,5,3',5'-tetrabromobisphenol A (TBBPA)<sup>10</sup>. En concreto, algunos congéneres de la familia de los PBDEs y el TBBPA, junto con otros compuestos fenólicos, son los BFRs de mayor volumen de consumo mundial<sup>1,11</sup>.

##### II.3.1.1.1. PBDEs y PBBs

Los PBDEs y los PBBs son estructuralmente similares a los PCBs, aunque en el caso de los PBDEs, con un átomo de oxígeno entre los dos anillos aromáticos. Por tanto, su estudio resulta interesante teniendo en cuenta que sus efectos negativos para el medioambiente y la salud humana, en tanto que son bioacumulables y resistentes a la degradación, también son similares<sup>1</sup>.



Dentro de estas tres formulaciones, la mezcla decaBDE es la más empleada<sup>12</sup>. En concreto, en Europa se ha prohibido el uso de pentaBDE y octaBDE debido a sus demostrados efectos nocivos en la salud humana; por lo que, es de esperar que la demanda de decaBDE continúe aumentando.

Sin embargo, a pesar de su prohibición, estas sustancias siguen presentes en un importante número de productos todavía en circulación, por lo que su introducción en el medioambiente continuará produciéndose a lo largo de la vida útil del producto (potencialmente varias décadas). Además, el aumento en el uso de decaBDE hace necesario tener un mayor conocimiento de sus procesos de degradación, relacionados con la presencia de PBDEs de menor grado de bromación en muestras ambientales. De hecho, en estudios recientes, se ha confirmado la debromación del decaBDE y la presencia de productos, identificados como PBDEs menos bromados<sup>17,18</sup>.

En la **Tabla II.3.1.1.1** se recogen las estructuras de los PBDEs y PBBs objeto de estudio en este trabajo, así como algunas propiedades físico-químicas de interés, centrándose en los congéneres de menor grado de bromación que son los que se encuentran en mayor proporción en muestras ambientales.

En cuanto a sus propiedades físico-químicas, en general, los PBDEs son sólidos a temperatura ambiente, presentan un rango de puntos de ebullición, que se encuentra entre los 80°C, para el BDE-47 (tetraBDE), hasta los 300°C, para el BDE-209 (decaBDE).

En cuanto a su volatilidad, su presión de vapor depende del contenido en bromo del compuesto, así, los congéneres con mayor grado de bromación son más pesados y consecuentemente menos volátiles<sup>21</sup> (ver **Tabla II.3.1.1.1**).

Su solubilidad en agua es relativamente baja, especialmente para los BDEs más bromados, y teniendo en cuenta los valores del coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) se pueden considerar sustancias lipofílicas. Considerando estas propiedades, podemos presuponer que los fenómenos de adsorción marcarán su distribución en el medioambiente<sup>19</sup>.

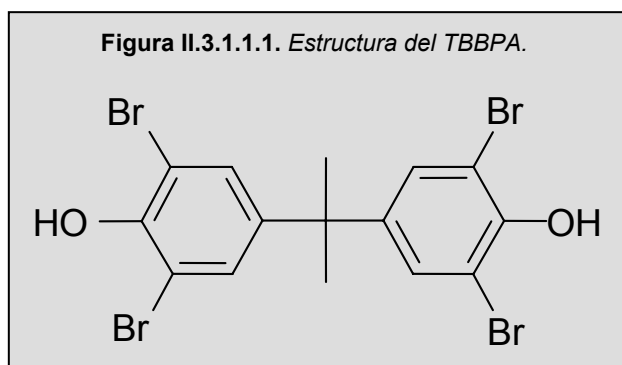
Los valores de  $\log K_{ow}$ , además, nos dan una idea del posible grado de bioacumulación del compuesto<sup>20</sup>. Así, valores altos del  $\log K_{ow}$  indican una mayor lipofilia y por tanto una mayor tendencia a acumularse en los tejidos biológicos. Los valores del  $\log K_{ow}$  oscilan entre 5.9-6.2 para los tetraBDEs, 6.5-7.0 para los pentaBDEs, 8.4-8.9 para los octaBDEs y 10 para el DecaBDE<sup>15</sup>.

**Tabla II.3.1.1.1.** Nombre, nomenclatura según la IUPAC, solubilidad en agua ( $S$ ), presión de vapor ( $P_a$ ), coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y estructura química de los PBDES<sup>19</sup> y PBBs<sup>20</sup> objeto de estudio.

Nombre	Nomenclatura (IUPAC)	$S_{25^\circ C}$ (mg/L)	$P_{25^\circ C}^o$ (Pa)	Log $K_{ow}$	Estructura química
BDE-3	4- bromofenilfeniléter	-	0.259	4.85	
BDE-47	2,2',4,4'- tetrabromodifeniléter	$1.5 \times 10^{-2}$	$1.86 \times 10^{-4}$	6.55	
BDE-99	2,2',4,4',5- pentabromodifeniléter	$9.4 \times 10^{-3}$	$1.76 \times 10^{-5}$	7.13	
BDE-100	2,2',4,4',6- pentabromodifeniléter	$4.0 \times 10^{-2}$	$2.86 \times 10^{-5}$	6.86	
BDE-85	2,2',3,4,4' - pentabromodifeniléter	$6.0 \times 10^{-3}$	$9.86 \times 10^{-6}$	7.03	
BDE-153	2,2',4,4',5,5'- hexabromodifeniléter	$8.7 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-6}$	7.62	
BDE-154	2,2',4,4',5,6'- hexabromodifeniléter	$8.7 \times 10^{-4}$	$3.80 \times 10^{-6}$	7.39	
PBB-15	3,5-dibromo-1,1'- bifenilo	-	-	5.43	
PBB-49	2,2',4,5'-tetrabromo- 1,1'-bifenilo	-	-	4.90	

## II.3.1.1.2 TBBPA y otros compuestos ignífugos fenólicos.

El TBBPA comercial es uno de los BFRs de mayor volumen de producción a nivel mundial<sup>11</sup>. Como se puede ver en su estructura, mostrada en la **Figura II.3.1.1.1**, presenta dos anillos fenólicos con dos átomos de bromo en cada uno.



Otros BFRs fenólicos comercializados son, el 2,4-dibromofenol (2,4-DBP), el 2,4,6-tribromofenol (TBP), el pentabromofenol (PBP) y el 3,5,3',5'-tetraclorobisfenol A (TCBPA)<sup>1</sup>. Además, compuestos como el 2,6-dibromofenol (2,6-DBP) y el 2,4,6-tribromofenol (TBP), pueden formarse como subproductos en los procesos de descomposición de materiales plásticos que contengan el TBBPA<sup>22,23</sup>.

Considerando estas observaciones parece interesante el estudiar este grupo de compuestos en conjunto como la familia de los compuestos ignífugos fenólicos.

**Tabla II.3.1.1.2. Nombre, presión de vapor ( $P^o$ ), solubilidad en agua ( $S$ ), valor de la constante de Henry ( $H$ ), coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) de los compuestos ignífugos fenólicos considerados.**

Compuesto (Acrónimo)	$P^o_{25^\circ\text{C}}$ (Pa)	$S_{25^\circ\text{C}}$ (mg/L)	$H_{25^\circ\text{C}}$ (Pa m <sup>3</sup> /mol)	Log $K_{ow}$
2-bromofenol (2-BP)	42	-	-	2.47
2-bromo-4-metilfenol (2-B-4-MP)	14.9	-	-	2.93
4-bromo-3-metil fenol (4-B-3-MP)	2.17	-	-	2.95
2,6-dibromofenol (2,6-DBP)	1.27	-	-	3.41
2,4-dibromofenol (2,4-DBP)	3.65	2080	$3.65 \times 10^{-2}$	3.22*/3.43
2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBP)	0.20	59	$4.83 \times 10^{-3}$	4.13*/4.33
Pentabromofenol (PBP)	$5 \times 10^{-5}$	0.1	$8.41 \times 10^{-4}$	6.10
3,5,3',5'-tetraclorobisfenol A (TCBPA)	$6.57 \times 10^{-5}$	0.70	-	5.68
3,5,3',5'-tetrabromobisphenol A (TBBPA)	$1.88 \times 10^{-5}$	0.08	$7.09 \times 10^{-6}$	4.54*/7.29

\*determinados experimentalmente

En cuanto a sus propiedades físico-químicas (ver **Tabla II.3.1.1.2**), al igual que el caso de los PBDEs, se encuentran en relación directa con el contenido de bromo de los compuestos. Así, los bromofenoles de mayor grado de bromación y los bisfenoles, presentan unos valores de  $\log K_{ow}$  relativamente altos, por lo que pueden considerarse compuestos lipofílicos, a pesar de presentar una solubilidad en agua relativamente alta<sup>24</sup>. Ambas características van a favorecer su distribución en el medioambiente.

La volatilidad de los compuestos también depende del contenido de bromo, así los compuestos menos bromados pueden considerarse relativamente volátiles mientras que los más pesados no presentan tendencia a la volatilización. Si los comparamos con los PBDEs, por ejemplo, el TBBPA presenta una menor volatilidad con respecto a los PBDEs más pesados. En cambio, su  $\log K_{ow}$  determinado experimentalmente tiene un valor de 4.54 (ver **Tabla II.3.1.1.2**), indicando un carácter menos lipofílico, aunque sus derivados alquilados pueden presentar  $\log K_{ow}$  mayores<sup>25</sup>.

### II.3.1.2 PRODUCCIÓN Y USOS

La comercialización de los compuestos bromados como ignífugos comenzó sobre la década de los 60<sup>1</sup>. En concreto, fueron los PBBs los primeros compuestos bromados introducidos en el mercado como ignífugos, para sustituir a los PCBs en ciertas aplicaciones tras su prohibición. Hoy en día los PBBs ya no se utilizan. Su producción se prohibió en US a finales de la década de los 70 y el último fabricante Europeo cesó la producción en el 2000<sup>2</sup>. La demostración de sus propiedades tóxicas (están clasificados como posibles cancerígenos)<sup>26</sup> y de su persistencia<sup>16</sup>, tras una intoxicación accidental con estos productos fue el desencadenante de esta prohibición. A pesar de ello, todavía es posible encontrar estos compuestos en algunos productos obsoletos.

Más tarde, comenzaron a introducirse en el mercado otros compuestos bromados como los PBDEs o el TBBPA. No obstante, no es hasta la década de los 90, cuando se dispara la demanda y producción de los BFRs, en cierta medida debido al auge en el desarrollo de productos informáticos y electrónicos.

Mientras que en 1992 la producción estimada era de 40.000 toneladas (Tn), en 1998 los datos indicaban que la producción media anual de BFRs excedía las 150.000 Tn, duplicándose esta cifra un año después, es decir, sobre 300.000 Tn en 1999<sup>9,17,27,28</sup>.

En cuanto a los bromofenoles, el 2,4,5-TBP es el que presenta el mayor volumen de producción a nivel mundial. También se producen 2,4-DBP y PBP pero en mucho menor

proporción.

En la **Tabla II.3.1.2.** se recoge la demanda anual (en toneladas) de cada uno de los BFRs mayoritarios, correspondientes a los años 1999 y 2001, donde puede apreciarse como los productos comerciales TBBPA y decaBDE fueron los más empleados.

**Tabla II.3.1.2.1.** *Volúmenes de consumo estimados (en toneladas) de los principales compuestos ignífugos bromados (1999 y 2001<sup>9</sup>)*

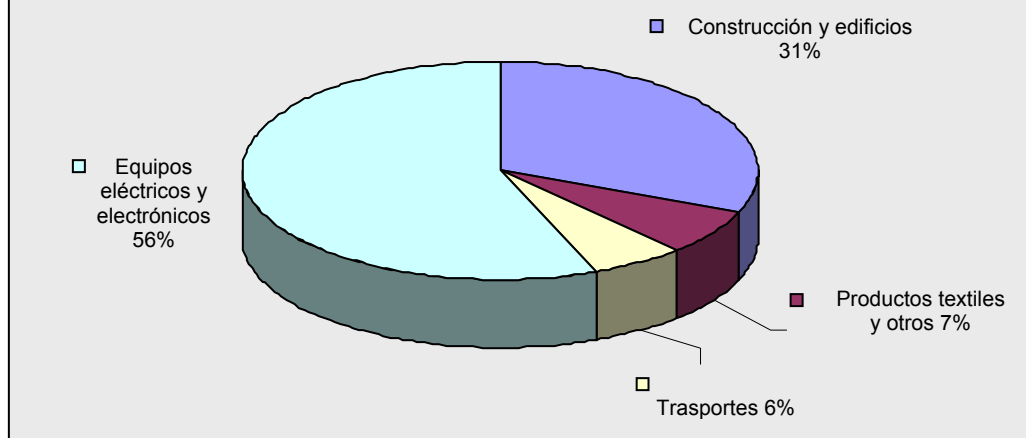
BFRs	1999	2001
2,4,6-TBP	-	9,500
TBBPA	121,300	119,700
HBCD	15,900	16,700
DecaBDE	54,800	56,100
OctaBDE	3,825	3,790
PentaBDE	8,500	7,500

Por otra parte, dependiendo de su presencia en el producto final, los BFRs se pueden dividir en dos tipos de compuestos, los reactivos y los aditivos<sup>29</sup>. Los reactivos, como el TBBPA se enlazan covalentemente al polímero durante el proceso de fabricación<sup>27</sup>. Sin embargo, los aditivos, como los PBDEs, el HBCD o los PBBs, simplemente se mezclan o disuelven en el material (antes, durante o después de la polimerización) y pueden liberarse fácilmente del mismo<sup>28</sup>. Los bromofenoles, sin embargo, no se utilizan directamente como ignífugos sino que se utilizan como intermediarios químicos en la síntesis de otros productos o en tratamientos de madera.

Tal como se comentó, la principal aplicación de BFRs es en productos eléctricos o de equipamiento electrónico como, carcasas plásticas de pequeños equipos de oficina y electrodomésticos, televisores, en componentes eléctricos y cables, y en plásticos de polietileno (PE)<sup>28</sup> (ver **Figura II.3.1.2.1<sup>9</sup>**). También pueden encontrarse en productos textiles y otros materiales de construcción.

La tendencia que se sigue actualmente es intentar reducir el consumo de BFRs, reemplazándolos por compuestos ignífugos no halogenados. Esto se debe principalmente a la preocupación por los efectos toxicológicos que pueden presentar los compuestos con halógenos pesados y los cambios en materia de regulación de estos compuestos<sup>29</sup> (ver **Apartado II.3.1.5**).

**Figura II.3.1.2.1. Distribución (en %) de la aplicación de BFRs en diferentes productos de consumo.**



### II.3.1.3. DISTRIBUCIÓN Y PRESENCIA EN EL MEDIOAMBIENTE

Debido a que las aplicaciones de los BFRs son muy diversas, pueden existir múltiples fuentes y rutas de transporte de estos compuestos en el medioambiente. Así, las industrias que manufacturan o aplican BFRs en sus productos (como la industria textil, automovilística o electrónica) constituyen fuentes potenciales de liberación de los BFRs en el ambiente<sup>10</sup>.

A su vez, los productos que contienen BFRs pueden ser fuentes de contaminación durante toda su vida útil. La liberación de los compuestos por volatilización o lixiviado resulta un foco importante de contaminación, sobretodo en el caso de productos de uso doméstico o en empresas. La eliminación de estos productos, mediante combustión, reciclado o acumulación en vertederos, constituye la última ruta de entrada de BFRs en el ambiente<sup>6,23</sup>.

En 1979, se publicó la primera evidencia de la presencia de BFRs en muestras ambientales, en concreto en muestras de suelos y lodos de los alrededores de una planta de producción de BFRs en US<sup>30</sup>.

En principio, los niveles de BFRs son mayores en las cercanías de fuentes industriales<sup>23,31-33</sup>; sin embargo, se han detectado ciertos compuestos en muestras de aire recogidas en zonas árticas y en especies marinas de distintas localizaciones<sup>7,32</sup>, como el océano Ártico, Japón y el mar del Norte<sup>10,34</sup>. Esto demuestra que pueden sufrir diferentes rutas de transporte y no degradarse llegando a áreas remotas, lejos del origen de la contaminación.



Como ya se introdujo en el **apartado II.3.1.1**, los BFRs son sustancias lipofílicas y poco solubles en agua, por lo que presentan tendencia a sufrir fenómenos de adsorción sobre diferentes partículas como el polvo, sedimentos o el suelo. El transporte de estas partículas por el arrastre del aire explica la gran distribución que pueden sufrir estos compuestos<sup>7</sup>.

A lo largo de las últimas décadas, se han publicado diferentes estudios que confirman la presencia de los BFRs tanto en tejidos humanos como en especies animales, y en otras muestras ambientales como sedimentos, lodos, polvo, suelos y muestras de agua, en US, Canadá, el norte de Europa y Japón<sup>2,7,23,31-35</sup>.

Sin embargo, la mayoría de estos estudios se centra en la presencia de la familia de los PBDEs. Estas investigaciones demuestran que el destino ambiental de los PBDEs depende del número de bromos de la molécula, es decir, del congénere específico. Los congéneres menos bromados, como los tetra- y pentaBDEs, presentan mayores presiones de vapor, por lo que es habitual su presencia en muestras de aire<sup>2</sup>, mientras que los más pesados, como el decaBDE predominan en sedimentos, lodos o muestras de polvo. Aunque, como ya se ha comentado, el decaBDE es susceptible de sufrir degradación y producir BDEs de menor grado de bromación. Esto se traduce en un aumento de las concentraciones de, sobre todo, tetra a hexa BDEs en muestras medioambientales<sup>36,37</sup>.

En cuanto a los BFRs fenólicos, existen muy poca información sobre la presencia de estos compuestos en el medioambiente. El TBBPA se ha investigado, junto con el TCBPA, en diferentes muestras ambientales, como muestras de agua<sup>38,39</sup>, suelos, sedimentos y lodos de depuradora<sup>1,40-44</sup>.

La presencia de otros compuestos bromados como 2-BP, 4-BP, 2,4-DBP, 2,6-DBP y TBP, se relaciona con los procesos de tratamiento de agua. Su determinación, también resulta de interés si consideramos que son los responsables del sabor a plástico que presentan las aguas de bebida cloradas<sup>45</sup>. En concreto, el umbral de sabor se encuentra en 0.5 ng/L para el 2,6-DBP.

Las concentraciones máximas encontradas en aguas superficiales (en concreto agua de río contaminada) fueron 40, 3 y 0.3 ng/mL para 2,4-DBP, 2,6-DBP y 2,4,6-TBP, respectivamente<sup>44</sup>. Sin embargo, las concentraciones normales suelen ser un orden de magnitud inferiores<sup>41</sup>.

En al **Tabla II.3.1.3.1**, se resumen las concentraciones encontradas de los principales BFRs en diferentes muestras ambientales.

**Tabla II.3.1.3.1** Concentraciones representativas de las diferentes familias de BFRs en el medioambiente<sup>2,7,23,31,32,35,46,47</sup>.

Muestras	pentaBDE	decaBDE	HBCD	TBBPA
Aire (ng/m <sup>3</sup> )	0.005-0.052 (EEUU) 4-650 (Suecia) 3-76 (Suecia)	<0.0001-0.0003 (US)	1070 (zona industrial, Suecia) 0.005-0.006 (Suecia)	1800 (zona de producción, Japón) 0.010 - 2.1 (Canadá)
Agua (ng/L)	7.6 – 74 (Canadá, agua superficial)	-	3 -9 (escorrentías, Suecia) 31 (efluente lavandería)	-
Lodos (ng/g peso seco)	1100-2290 (US)	85-4890 (US)	4-650 (Suecia)	3-76 (Suecia)
Suelo (µg/kg peso seco)	76 (zona industrial, US)	19-36 (zona industrial, US)	140-1300 (zona industrial, Suecia)	0.5-140 (Japón)
Sedimentos (µg/kg peso seco)	n.d. - 52 (EEUU) 132 (zona industrial, US)	5000 (punto de contaminación, US)	n.d.-7600 (Suecia)	2-150 (Japón)

Como apuntábamos al inicio del apartado, otro de los problemas ambientales que presentan los BFRs es la eliminación de los productos que los contienen. En este sentido, es importante indicar que algunos compuestos (PBDEs y TBBPA) pueden producir otras sustancias químicas tóxicas, durante los procesos de incineración y reciclado de productos de desecho, o durante procesos de degradación ambiental<sup>48-49</sup>.

Así, además de los posibles riesgos para la salud y el medio ambiente causados por los BFRs durante su producción y su utilización, se suma la preocupación por la posible formación de p-dibenzodioxinas y furanos polibromados (PBDD/Fs), u otros productos más tóxicos que los originales como PBDEs de bajo grado de bromación y diferentes bromofenoles.

#### II.3.1.4. EXPOSICIÓN Y TOXICIDAD

Dada la ubicuidad y persistencia de los BFRs en el medioambiente, no es de extrañar que estos compuestos sean asimilados por los seres vivos. Al igual que los PCBs, los BFRs pueden experimentar fenómenos de bioacumulación y biomagnificación a través de las cadenas tróficas. En este sentido, los compuestos menos bromados se encuentran en mayor proporción en muestras biológicas, indicando que los compuestos de mayor grado de bromación son susceptibles de degradación metabólica<sup>2</sup>.

Las rutas de exposición de los seres humanos a los BFRs todavía están poco caracterizadas, aunque lo más probable es que se produzca a través de la alimentación o la inhalación de partículas con los compuestos adsorbidos<sup>35,50</sup>. Los BFRs también se pueden evaporar desde los productos que los contienen y depositarse en partículas de polvo, fácilmente asimilables<sup>23</sup>. La absorción a través de la piel por contacto con los productos no contribuye sustancialmente en la asimilación de estos compuestos.

Por otra parte, se han detectado otras rutas de exposición laboral en industrias de elaboración de productos electrónicos y equipos informáticos, por la presencia de BFRs en concentraciones elevadas en muestras de sangre de los trabajadores<sup>12</sup>.

En cuanto a sus efectos tóxicos, en general, los BFRs no presentan una toxicidad aguda alta, aunque como los PCBs pueden presentar efectos crónicos importantes a largo plazo.

La mayoría de los estudios toxicológicos realizados sobre BFRs están incompletos, sin embargo, basándose en los datos disponibles se conoce que los BFRs son neurotóxicos, disruptores endocrinos y (algunos PBDEs) probablemente cancerígenos<sup>51-53</sup>.

Además, existe información que confirma que los BFRs pueden causar efectos negativos en el sistema inmunológico y en el sistema reproductor, aunque sus efectos teratogénicos no están confirmados. También se dispone de evidencias de la actividad como estrógenos de los PBDEs, TBBPA y otros BFRs fenólicos, aunque se necesitan más estudios para determinar si exposiciones a dosis bajas pueden tener actividad como estrógenos en humanos u otras especies<sup>2,23,54,55</sup>.

### **II.3.1.5. LEGISLACIÓN APLICABLE**

Teniendo en cuenta la información discutida en los apartados anteriores sobre la extensa distribución de los BFRs en el medioambiente y las evidencias sobre sus posibles efectos tóxicos para la salud, estos deberían ser retirados poco a poco del mercado.

Siguiendo esta línea diferentes organismos nacionales e internacionales están implementando medidas para la retirada paulatina de los BFRs.

La OSPAR (comisión Oslo-París) en su convención de 1998 marcó las directrices para el control de la emisión y descarga de sustancias peligrosas al medio marino, incluyendo entre estas sustancias ciertos BFRs como los PBDEs<sup>56</sup>.

Continuando esta estrategia, en la OSPAR 2005 se incluye al TBBPA dentro de las sustancias de acción prioritaria<sup>57</sup>. Se ha propuesto también como objetivo la evaluación de los riesgos asociados a estos compuestos, confirmando la necesidad de su sustitución por otros compuestos menos perjudiciales<sup>58-61</sup>.

En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (WHO 1998) recomienda la sustitución de los BFRs por otros compuestos no halogenados<sup>28</sup>. Este objetivo también se recoge dentro de dos directivas de la Unión Europea propuestas en el 2000<sup>62,63</sup>. La primera sobre residuos eléctricos y equipamiento electrónico (*Waste Electric and Electronic Equipment, WEEE*) tiene como objetivo principal responsabilizar de la recogida y eliminación de residuos los *WEEE* a los productores, y la segunda, enfocada a la restricción de ciertas sustancias, tiene como objetivo la retirada de las mismas en los *EEE*, grupo en el que se incluyen los penta- y octaBDEs. Previamente, en 1995, ya se había establecido un compromiso voluntario por parte de las industrias implicadas en la utilización y producción de BFRs, para la eliminación paulatina de PBBs y PBDEs<sup>64</sup>.

Algunos compuestos fenólicos como el 2,4-DBP, TBP, PBP y derivados del TBBPA están incluidos en la lista de sustancias tóxicas (*Master Testing List, MTL*) de la agencia americana para la prevención y protección del medioambiente (*US EPA*)<sup>65</sup>. Además, recientemente, la Directiva comunitaria 2006/0129 (COD) ha establecido como norma de calidad ambiental (NCA) el límite de 0.5 pg/mL de concentración media anual para en pentaBDE en aguas superficiales y 0.2 pg/mL en otras aguas superficiales<sup>66</sup>.

Como ya se comentó, no sólo los BFRs pueden presentar efectos negativos, sino que sus productos de degradación (como los PBDDs y PBDFs) pueden ser incluso más nocivos, por lo deben estar sujetos a algún tipo de control. En Alemania, por ejemplo, se han establecido controles de emisión en las incineradoras de residuos municipales, imponiéndose límites a la liberación de dioxinas y furanos bromados<sup>28</sup>.

### II.3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MUESTRAS AMBIENTALES

En la bibliografía se recogen varios métodos analíticos de identificación y cuantificación de BFRs en muestras medioambientales, distinguiéndose en todos ellos dos etapas fundamentales: la preparación de la muestra, incluyendo la extracción de los analitos de la matriz, y el análisis para evaluar el contenido de analitos en la muestra.

### II.3.2.1. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA

Uno de los problemas fundamentales en la etapa de preparación de la muestra es la introducción de contaminación durante la manipulación de la misma. En el caso de los BFRs, en principio parece poco probable que se produzcan fenómenos de contaminación; sin embargo, ciertos estudios confirman la posibilidad de contaminación del aire del laboratorio con ciertos congéneres de la familia de los PBDEs y por TBBPA<sup>67</sup>.

Para evitar blancos con elevado contenido en BFRs hay que limpiar el material de vidrio adecuadamente y procurar que la exposición directa de la muestra al aire del laboratorio sea mínima.

Por lo general, los BFRs son extraídos de la muestra y el extracto es purificado, fraccionado y concentrado antes de su análisis. El procedimiento de extracción es función de la matriz de la muestra; así, se emplearán distintos métodos para muestras sólidas (sedimento, suelos, tejidos biológicos) o muestras líquidas<sup>68</sup>.

Entre las técnicas de extracción aplicadas al análisis de BFRs se incluyen: técnicas clásicas, como la extracción Soxhlet o la extracción líquido-líquido, la extracción con fluidos supercríticos (*Supercritic Fluid Extraction, SFE*), la extracción en fase sólida (*SPE*), o más recientemente la extracción con agua caliente presurizada (*Pressurized Hot Water Extraction, PHWE*) o la microextracción en fase sólida (*SPME*).

Para el análisis de muestras sólidas, la extracción Soxhlet es el método de extracción más clásico. La principal ventaja que presenta es que el proceso de extracción es un proceso continuo, aunque los compuestos sensibles a altas temperaturas podrían degradarse. Además se requiere un tiempo excesivamente largo y un volumen importante de disolvente para conseguir una buena extracción. Esta técnica se ha utilizado en la extracción BFRs de las carcasas plásticas de equipos electrónicos<sup>69</sup> y en el análisis de matrices medioambientales (sedimentos)<sup>70</sup>.

*Kuosmanen et al.*<sup>1</sup> utilizaron la técnica *PHWE* en el análisis de muestras de sedimento como alternativa a las técnicas de extracción tradicionales. El rango de temperatura habitual en *PHWE* es de 200-300 °C, siendo la temperatura el principal parámetro para el control de las propiedades físico-químicas del agua, de la velocidad de extracción y de la eficiencia y la selectividad del método.

En la *SFE* se utilizan presiones y temperaturas altas de forma que el fluido supercrítico (en la mayoría de los casos CO<sub>2</sub>) tenga propiedades de gas, facilitando la solubilización de los analitos en el fluido y aumentando la eficacia de la extracción.

La principal ventaja de esta técnica es que no son necesarias grandes cantidades de CO<sub>2</sub> y éste es relativamente barato. El principal inconveniente que presenta es que para la extracción de compuestos relativamente polares se necesitan modificadores, para aumentar la polaridad del CO<sub>2</sub>. Por esta técnica se pueden analizar tanto muestras líquidas como sólidas, aunque en el caso de muestras líquidas es preferible utilizar un adsorbente para retener los analitos de interés y posteriormente aplicarle la *SFE*<sup>71</sup>. Esta técnica se ha aplicado con éxito a la extracción de PBDEs en muestras de tejido adiposo humano<sup>71</sup> y en muestras de sedimento<sup>72</sup>.

En el caso de la SPE, la muestra se hace pasar a través de cartuchos que contienen el adsorbente adecuado para los compuestos objeto de estudio, que después se eluyen con disolventes orgánicos. La técnica de SPE se ha aplicado al análisis de BFRs en muestras biológicas<sup>74</sup>, utilizando como adsorbente un copolímero de estireno-divinilbenceno. También se ha aplicado en la determinación de BFR fenólicos<sup>75,76</sup>.

La SPME resultaría una alternativa interesante para estos análisis, ya que no requiere el uso de disolventes orgánicos y minimiza la manipulación de la muestra; sin embargo, hasta el momento las aplicaciones basadas en esta técnica para el análisis de BFRs son muy limitadas<sup>77,78</sup>.

### II.3.2.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN

El problema general en el análisis medioambiental de los BFRs es la presencia de interferencias matriciales que, en ocasiones, pueden coeluir con los analitos e interferir en el análisis cuantitativo. Por tanto, son necesarios sistemas suficientemente sensibles y selectivos de detección.

A pesar de que el detector de captura electrónica (ECD) presenta una alta sensibilidad para los compuestos halogenados, en ocasiones carece de selectividad suficiente. Así, aunque se han propuesto métodos basados en GC-ECD en diferentes matrices, en la mayoría de los casos se han encontrado problemas por la presencia de interferencias, principalmente PCBs<sup>16,72</sup>.

La técnica más utilizada en este tipo de análisis es la GC acoplada a la espectrometría de masas de baja resolución (LRMS) en modo de ionización química negativa (ECNI)<sup>15,16,18</sup>. Ésta técnica presenta una sensibilidad comparable al ECD, y además permite la identificación de los compuestos bromados, ya que el espectro ECNI está dominado por las masas 79 y 81 correspondientes al ión bromo. Sin embargo si se necesita una mayor especificidad y precisión

de los resultados es preferible la ionización electrónica (EI), a pesar de su menor sensibilidad<sup>36,78</sup>.

En el caso de ser necesarias una alta sensibilidad, selectividad y precisión, simultáneamente, es necesario recurrir a la espectrometría de masas de alta resolución (EI-HRMS), aunque se trata de una técnica bastante costosa<sup>79-81</sup>.

Como alternativa, *Vonderheide et al.* desarrollaron un método basado en GC acoplada a la espectrometría de masas con ionización de plasma (ICP-MS)<sup>82</sup>. El ICP-MS presenta ventajas como una buena sensibilidad para los compuestos bromados, así como excelente selectividad en presencia de otros compuestos que contengan sulfuro o cloro, interferencias frecuentes en matrices medioambientales. Esta técnica se aplicó al análisis de PBDEs en muestras de lodos del tratamiento de aguas residuales. Los límites de detección obtenidos oscilan entre 0.07 y 0.2 ng/mL.

En cuanto a las características de las columnas cromatográficas, en general, para conseguir la separación de los distintos isómeros se suelen utilizar columnas capilares, aunque es indispensable un programa de temperaturas apropiado. En al **Tabla II.3.1.5.2.1** se resumen las columnas utilizadas en el estudio realizado por *Sjödín et al.*<sup>83</sup>, para la identificación de los congéneres presentes en la mezcla comercial *Bromkal 70-5DE*.

**Tabla II.3.2.2.1.** Características de las diferentes columnas capilares de alta resolución utilizadas por *Sjödín et al.*

Instrumento	Columna	Fase Estacionaria	Dimensiones	Polaridad
GC-ECD	CPSil-8	5%-fenilmetilpolisiloxano	50m x 0.25 mm x 0.25 µm	Baja
GC-ECD	HP-1701	14%-copolímero de cianopropilfenildimetil polisiloxano	60m x 0.25 mm x 0.25 µm	Media
GC-ECD	SP-2380	90%-Biscianopropil cianopropilfenilsiloxano	30m x 0.32 mm x 0.20 µm	Muy alta
GC-ECD	SB-Smetic	Bifenilcarboxilato éstermetilpolisiloxano	25m x 0.32mm x 0.15 µm	Media
GC-MS	DB-5MS	5%-fenilmetilpolisiloxano	15m x 0.32mm x 0.25 µm	Baja

Respecto al análisis de BFRs fenólicos, se pueden encontrar en la bibliografía varios métodos basados en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS-MS)<sup>44,45</sup>, aunque la GC-MS es la técnica más empleada<sup>17,84,85</sup>. En este caso es necesario un paso previo de derivatización, pudiendo aplicar diferentes reacciones como la acetilación, esterificación o metilación<sup>76</sup>.

La electroforesis capilar también se ha utilizado en el análisis de estos compuestos en muestras de agua obteniendo buenos resultados<sup>38,39</sup>.



**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) K. Kuosmanen, T. Hyötyläinen, K. Hartonen, M. Riekkola, J. Chromatogr. A 943 (2002) 113.
- (2) L.S. Birnbaum, D.F. Staskal, Environ. Health Perspect. 112 (2004) 9.
- (3) M. Alaei, R.J. Wenning, Chemosphere 46 (2002) 579.
- (4) A. Hassanin, K. Breivik, N. Meijer, E. Steinnes, G. Thomas, K. Jones, Environ. Sci. Technol., 38 (2004) 738.
- (5) J.H. Christensen, J. Platz, J. Environ. Monit. 3 (2001) 543.
- (6) R. Bloom, A. Eklund, P. Hedemalm, J. Hägsström, Brominated Flame Retardants, A Global Status Report, Orango Miljökonsulter, Gothenburg, 2000.
- (7) M. Alaei, P. Arias, A. Sjödin, A. Bergman, Environ. Int. 29 (2003) 6839.
- (8) C. Lassen, S. Lokke, Brominated Flame Retardants: Substance Flow Analysis and Assessment of Alternatives No. 494. Danish Environmental Protection Agency, Report 494, ISBN 87-7909-415-5, Copenhagen (1999).
- (9) Bromine Science and Environmental Forum (BSEF), Brominated Flame Retardants in consumer and commercial products, [www.bsef.com](http://www.bsef.com), (2001).
- (10) U. Sellström, Determination of some polybrominated flame retardants in biota, sediment and sewage sludge. Tesis Doctoral, Universidad de Estocolmo, Suecia, 1999.
- (11) J.B. Manchester-Neesvig, K. Valters, W.C. Sonzogni, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 1072.
- (12) F. Rahman, K.H. Langford, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, The Science of The Total Environment 275 (2001) 1.
- (13) A. Palm, I. T. Cousins, D. Mackay, M. Tysklind, C. Metcalfe, M. Alaei, Environ. Pollut. 117 (2002) 195.
- (14) D. Oros, D. Hoover, F. Rodigari, D. Crane, J. Sericano, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 33.
- (15) B. Strandberg, N. Dodder, I. Basu, R. Hites, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 1778.
- (16) A. Sjödin, D.G. Patterson, A. Bergman, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3830.

- (17) M. Tysklind, U. Sellström, G. Söderström, C. de Wit, The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants, Estocolmo, Suecia, 2001.
- (18) S. Lacorte, M. Guillamón, E. Martínez, P. Viana, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 892.
- (19) S.A. Titlemier, T. Halldorson, G.A. Stern, G.T. Tomy, Environ. Toxicol. Chem. 21 (2002) 1804.
- (20) A.M.C.M. Pijnenburg, J.W. Evets, J. de Boer, J.P. Boon, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 141 (1995) 1.
- (21) S.A. Titlemier, G.T. Tomy, Environ. Toxicol. Chem. 20 (2001) 146.
- (22) J.W. Voordeckers, D.E. Fennell, K. Jones, M.M. Haggbloom, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 696.
- (23) C.A. de Witt, Chemosphere 46 (2002) 583.
- (24) H. Kuramochi, K. Maeda, K. Kawamoto, Organohalogen. Comp. 63 (2003) 337.
- (25) I. Watanabe, Tatsukawa, Anthropogenic brominated aromatics in the Japanese environment. Proceedings, Workshop on brominated aromatic flame retardants, Skokloster, Suecia, octubre 24-26, pp 63-721, 1989.
- (26) A. Hoque, A.J. Sigurdson, K.D. Burau, H.E. Humphrey, K.R. Hess, A.M. Sweeney, Epidemiology 9 (1998) 373.
- (27) H. Hakk. A survey of tetrabromobisphenol A. Second International Workshop on Brominated Flame Retardants, Mayo 14-16, Universidad de Estocolmo, Suecia, pp27-30 (2001).
- (28) Environmental Health Criteria 192. Flame retardants: A General Introduction. World Health Organization (WHO). Ginebre, Suiza, 1994.
- (29) J. Christensen, M. Gasius, M. Pécseli, J. Platz, G. Pritzl, Chemosphere, 47 (2002) 631.
- (30) V.J. DeCarlo, Annals of New York Academy of Science, 42 (1979) 561.
- (31) R. Hale, M. Alaei, J. Manchester-Neesvig, H.M. Stapleton, M.G. Ikonou, Environ. Int. 29 (2003) 771.
- (32) M. Remberger, J. Sternbeck, A. Palm, L. Kaj, K. Stromberg, E. Brorstrom-Lunden,

Chemosphere 54 (2004) 9.

(33) C.M. Butt, M.L. Diamond, J. Truong, M.G. Ikonomou, A. ter Schure, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 724.

(34) J. de Boer, Chemosphere 18 (1989) 2131.

(35) H.M. Stapleton, N.G. Dodder, J.H. Offenberger, M.M. Schantz, S.A. Wise, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 925.

(36) A. Covaci, J. de Boer, J. Ryan, S. Voorspoels, P. Scjepens, Anal. Chem. 74 (2002) 790.

(37) K. North, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 4484.

(38) E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 205.

(39) T.A. Verslycke, A.D. Vethaak, K. Arijs, C.R. Janssen, Environ. Pollut. 136 (2005) 19.

(40) U. Sellström, B. Jansson, Chemosphere 31 (1995) 3085.

(41) K. Öberg, K. Warman, T. Öberg, Chemosphere 48 (2002) 805.

(42) R. Saint-Louis, E. Pelletier, Analyst 129 (2004) 724.

(43) J. de Boer, C. Allchin, B. Zegers, J.P. Boon, S.H. Brandsma, S. Morris, A.W. Kruijt, I. van der Veen, J.M. van Hesseligen and J.J.H. Haftka, HBCD and TBBP-A in sewage sludge, sediments and biota, including interlaboratory study, RIVO Report No. C033/02, Septiembre 2002.

(44) C. Shaogang, G.D. Haffner, R.J. Letcher, J. Chromatogr. A 1097 (2005) 582

(45) J.L. Acero, P. Piriou, U. von Gunten, Water Res. 39 (2005) 2979.

(46) R. Hale, M. La Guardia, E. Harvey, M. Gaylor, T. Matteson-Mainor, W. Duff, Nature 412 (2001a) 140.

(47) B. Strandberg, N.G. Dodder, I. Basu, R.A. Hites, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 1078.

(48) J. Ebert, M. Bahadir, Environ. Int. 29 (2003) 711.

(49) R. Weber, B. Kuch Environ. Int. 29 (2003) 699.

(50) A. Schecter, M. Pavuk, O. Papke, J.J. Ryan, L.S. Birnbaum, R. Rosen Environ. Health Perspect. 111 (2003) 1723.

- (51) F.A. Simohsehk, O.M. Moller, T. Madsen, M. Stavnsbjerg, "Brominated Flame Retardants: Toxicity and Ecotoxicity", Danish Environmental Protection Agency, Project N° 568 (2000)
- (52) I.A.T.M. Meerts, J.J. van Zanden, E.A.C. Luijks, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, *Toxicol. Sci.* 56 (2000) 95.
- (53) M. Ghosh, I.A.T.M. Meerts, A. Cook, A. Bergman, A. Brouwer, L.N. Johnson, *Acta. Cryst. D* 56 (2000) 1085.
- (54) P.O. Darnerud, *Environ. Int.* 29 (2003) 841.
- (55) T.A. McDonald, *Chemosphere* 46 (2002) 745.
- (56) OSPAR Commission, 2001: Evaluation of the expected situation of the eutrophication status in the Maritime Area following the 50 % reduction target for nutrient inputs. ISBN 0-946956-76-6.
- (57) OSPAR Commission, 2005: OSPAR background document on tetrabromobisphenol-A. ISBN 1-904426-39-5.
- (58) European Union Risk Assessment Report bis(pentabromophenyl) ether [Decabromophenylether]. CAS: 1163-19-5; EINECS: 214-604-9. European Commission, Joint Research Centre, 2004.
- (59) European Union, Risk Assessment for diphenylether, Octabromo derivative (Octabromodiphenyl ether) CAS No: 32536-52-0; EINECS No: 251-087-9. European Chemicals Bureau, Reino Unido, 2003.
- (60) European Union risk assessment report for diphenyl ether, Pentabromo derivative (Pentabromodiphenyl ether). CAS: 32534-81-9. EINECS: 251-084-2. European Chemicals Bureau, Reino Unido, 2000.
- (61) EU Risk Assessment of TBBPA- Update. EU's Technical Committee on New and Existing Substances (TCNES), European Brominated Flame Retardant Industry Panel, Bruselas, Bélgica, Diciembre 2004.
- (62) Directive 2002/96/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on waste electrical and electronic equipment (WEEE). Official Journal L 037 , 13/02/2003 P. 0024 - 0039
- (63) Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. Official Journal L 037 , 13/02/2003 P. 0019 – 0023

- (64) Voluntary Industry Commitment by the US and European Producers of Selected Brominated Flame Retardants covered under the OECD's Risk Reduction Programme, 30 Junio 1995
- (65) Polybrominated Flame Retardants (PBFRs). Priority Existing Chemical Assessment Report. No. 20. National Industrial Chemicals Notification and Assessments Scheme (NICNAS), Australian Government, Marrickville, New South Wales, Junio 2001.
- (66) Comisión de las Comunidades Europeas. Propuesta 2006/0129 (COD) de la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Bruselas, 17-7-2006.
- (67) C. Thomsen, H. Leknes, E. Lundanes, G. Becher, J. Chromatogr. A, 923 (2001) 299.
- (68) T. Hyötyläinen, K. Hartonen, Trends Anal. Chem. 21 (1) (2002) 13.
- (69) M. Riess, R. van Eldik, J. Chromatogr. A 827 (1998) 65.
- (70) C.R. Allchin, R.J. Law, S. Morris, Environ. Pollut. 105 (1999) 197.
- (71) H.G. Janssen, X. Lou, "Supercritical fluid extraction in organic analysis. Extraction methods in organic analysis", Handley A. J. Sheffield Academic Press, 100-145, (1999)
- (72) G.L. Lindström, B. Hardell, E. Sundelin, G. Liljegren, P. Lindholm, Organohalogen. Comp. 35 (1997) 431.
- (73) K. Hartonen, S. Bowadt, S. Hawthorne, M.L. Riekkola, J. Chromatogr. A 774 (1) (1997) 229.
- (74) C. Thomsen, K. Janak, E. Lundanes, G. Becher, J. Chromatogr. B, 750 (1) (2001) 1.
- (75) T. Hayama, H. Yoshida, S. Onimaru, S. Yonekura, H. Kuroki, T. Kenichiro, H. Nohta, M. Yamaguchi, J. Chromatogr. B 809 (2004) 131.
- (76) C. Salgado-Petinal, M. Gracia-Chao, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 637.
- (77) M. Rodil, A. M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, Anal. Chem. 77 (2005) 2259.
- (78) H.M. Stapleton, T. Harner, M. Shoeib, J.M. Keller, M.A. Schantz, S.D. Leigh, S.A. Wise, Ana. Bioanal. Chem. 384 (2006) 791.

- (79) M. G. Ikonomou, S. Rayne, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5263.
- (80) D. Herzke, G.W. Gabrielsen, A. Evenset, I. C. Burkow, *Environ. Pollut.* 121 (2003) 293.
- (81) J. De Boer, C. Allchin, B. Zegers, J.P. Boon, *Trends Anal. Chem.* 10 (2001) 591.
- (82) A.P. Vonderheide., M. Montes-Bayón, J.A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.* 17(2002) 1480.
- (83) A. Sjödin, E. Jakobsson, A. Kierkegaard, G. Marsh, U. Sellström, *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 83.
- (84) M. del Olmo, A. Zafra, B. Suárez, A. González-Casado, J. Taoufiki, J. Vilchez, *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 167.
- (85) A. Zafra, M. del Olmo, B. Suárez, E. Hontoria, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Water Res.* 37 (2003) 735.

**II.4. LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) COMO ETAPA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.**

Dentro del proceso analítico, la preparación de la muestra es una de las etapas decisivas a la hora de obtener buenos resultados en los análisis. De hecho, en las últimas décadas, se han producido grandes avances en los métodos destinados a la preparación de muestra.

En este sentido, es importante destacar el importante impulso que ha experimentado en los últimos años la microextracción en fase sólida ó SPME, técnica de extracción/desorción desarrollada en 1989 por Belardy y Pawliszyn en la Universidad de Waterloo (Ontario, Canadá)<sup>1,2</sup>, que elimina la mayoría de los inconvenientes de las técnicas más conocidas de extracción, ya que no requiere el uso de disolventes, ni de tratamientos complejos para concentrar, tanto compuestos orgánicos volátiles, como no volátiles. Presenta, además, otras ventajas inherentes como el que apenas requiere tratamiento de la muestra, permite la automatización y puede aplicarse al análisis tanto de muestras líquidas y gaseosas, como de muestras sólidas, de forma indirecta.

En aplicaciones medioambientales, la SPME se ha utilizado para la extracción de contaminantes orgánicos tan importantes como los VOCs (compuestos orgánicos volátiles), los pesticidas (clorados, nitrogenados y fosforados), los hidrocarburos policíclicos aromáticos<sup>3</sup>, los PCBs (bifenilos policlorados) o los fenoles<sup>3,4</sup>.

Teniendo en cuenta lo anterior, es evidente que la elección de la SPME como técnica de extracción en el desarrollo de nuevos métodos para la determinación de contaminantes emergentes, no es una elección al azar, sino que sigue una tendencia marcada por la búsqueda de métodos sencillos, económicos y respetuosos con el medioambiente.

Siguiendo esta línea, en esta memoria de Tesis, se pretende conocer las posibilidades reales de esta técnica en la determinación de los contaminantes orgánicos seleccionados, por lo que, a continuación se dedica un apartado concreto a la descripción de la SPME y al estudio de los factores que potencialmente influirán en la extracción de matrices acuosas.

**II.4.1. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA**

La técnica de microextracción en fase sólida consiste en la exposición a la muestra de una microfibras recubierta con un material extractante, que puede ser un polímero líquido, un adsorbente sólido o una combinación de ambos. Éste recubrimiento retiene los compuestos a analizar por absorción, si se trata de un polímero líquido, o por adsorción, en el caso de recubrimientos sólidos. La cantidad extraída de analito guarda una relación directa con la concentración del mismo en la muestra, lo que permite la determinación cuantitativa de la concentración<sup>5,6</sup>.

A diferencia de los métodos tradicional, en los que se intentan extraer completamente los analitos de la muestra, en la SPME no se extraen cuantitativamente, ya que se trata de un equilibrio en el que la cantidad de fase polimérica utilizada es muy pequeña.

Además, la capacidad de usar la SPME cuantitativamente antes de que se alcance el equilibrio, permite establecer métodos mucho más rápidos y versátiles.

**II.4.1.1. Dispositivo de microextracción**

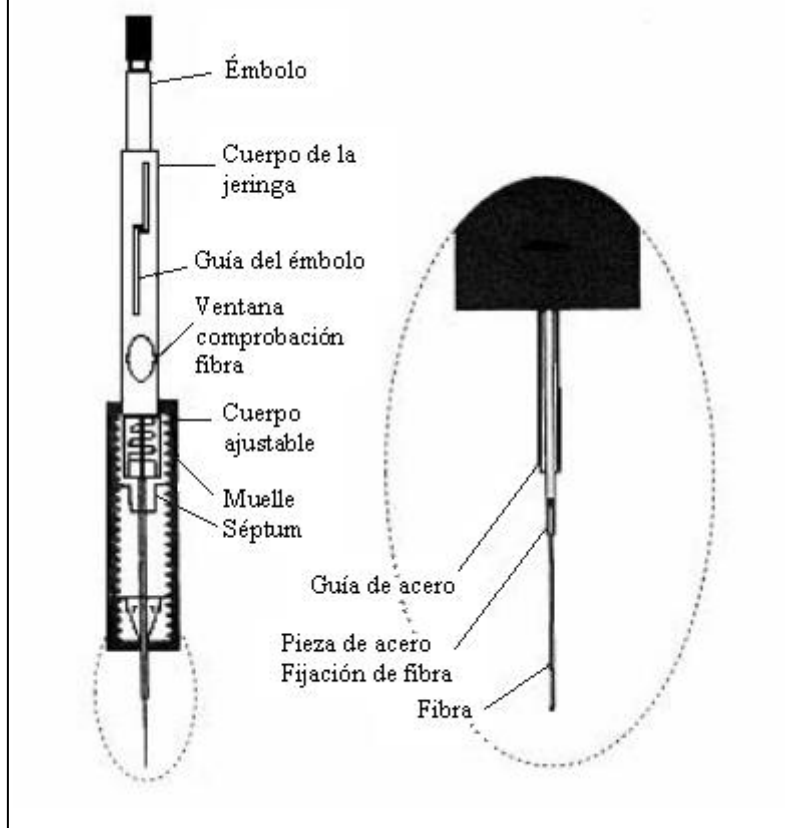
El dispositivo de SPME más utilizado es el fabricado por Supelco, y que consiste en una fibra de sílice fundida recubierta por distintos polímeros y fijada a una aguja de acero inoxidable.

La fibra se introduce en un soporte que puede describirse como una jeringa modificada. Consta de un émbolo, para permitir la exposición y protección de la fibra, un cuerpo metálico y un cuerpo ajustable, para la reproducibilidad en la colocación de la fibra.

En la **Figura II.4.1.1** se muestra el esquema del soporte descrito.



Figura II.4.1.1. Esquema del soporte de fibra.



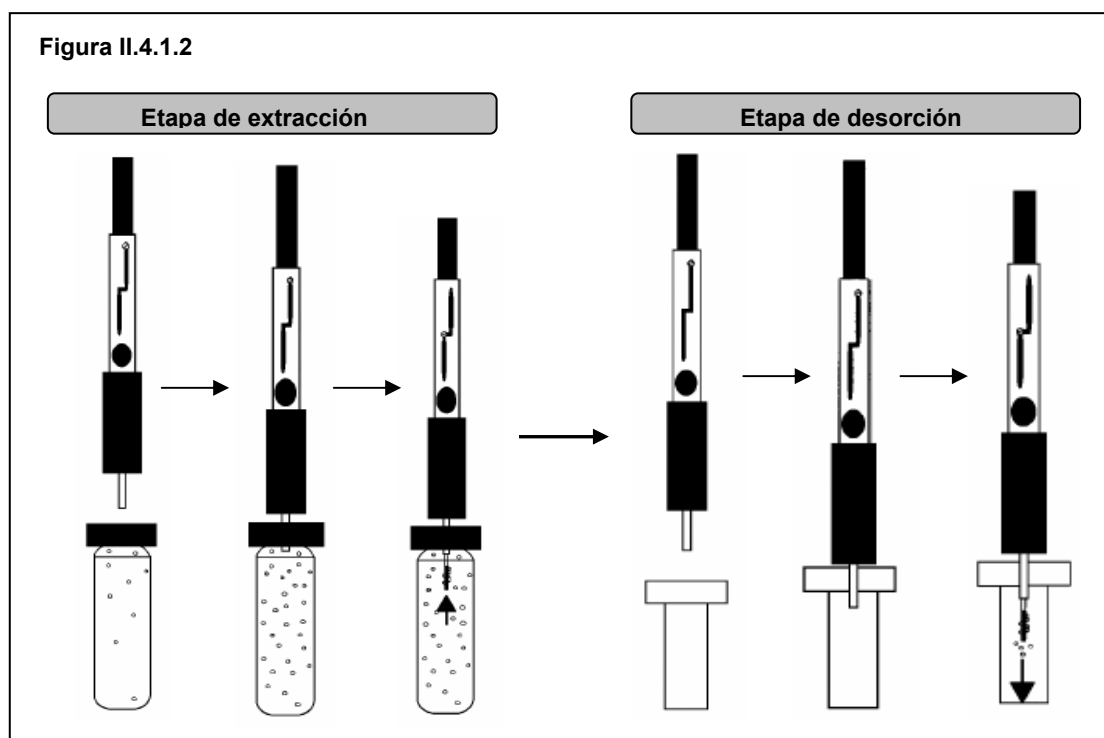
#### II.4.1.2. Procedimiento

El procedimiento de la SPME consta de dos etapas: extracción y posterior desorción. El esquema general de estas dos etapas, se muestra en la **Figura II.4.1.2**.

En principio la fibra está dentro de su protección de acero. Para realizar la extracción, se introduce esta protección a través del septum (previamente agujereado) del vial donde se encuentra la muestra, seguidamente, se presiona el émbolo para exponer la fibra a la muestra y que se produzca la extracción de los analitos.

Después de un tiempo determinado (tiempo de extracción) se hace ascender la fibra de nuevo a su protección y se extrae del vial. Inmediatamente se coloca el dispositivo en el instrumento de análisis, donde los analitos son liberados, bien por desorción térmica, por calentamiento en el inyector de un cromatógrafo de gases (CG), o por desorción en disolventes orgánicos, por contacto con la fase móvil de HPLC, haciendo uso de una interfase SPME/HPLC y una válvula de inyección modificada.

Figura II.4.1.2



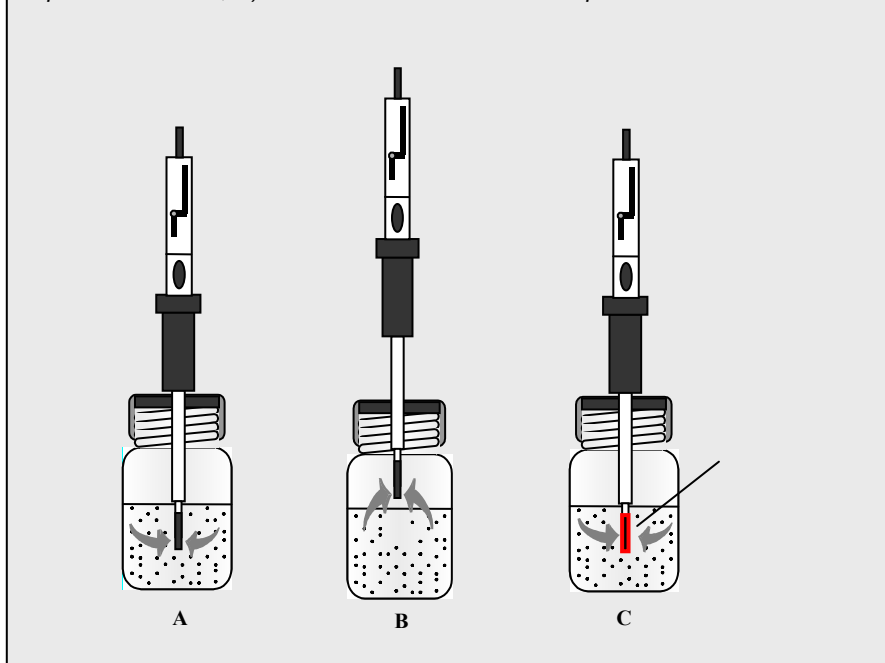
En la bibliografía se pueden encontrar numerosas aplicaciones de la SPME acoplada, tanto a técnicas basadas en cromatografía de gases (GC)<sup>7-13</sup>, como a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)<sup>14,15</sup> y a electroforesis capilar (EC)<sup>16,18</sup>.

#### II.4.1.3. Modos de trabajo en SPME

Dada la versatilidad de la técnica de microextracción, son posibles diferentes modos de trabajo que pueden adoptarse en función de las necesidades del problema analítico a resolver.

En principio, el muestreo de SPME puede realizarse siguiendo tres tipos básicos de extracción, representados en la **Figura II.4.1.3.1**<sup>6,19,20</sup>.

**Figura II.4.1.3.1. Modos de extracción:** A) Extracción directa; B) Extracción en espacio de cabeza; C) Extracción con membrana de protección.



*A) Extracción directa.*

El recubrimiento de la fibra se pone en contacto directo con la muestra y los analitos se transfieren directamente desde la matriz de la muestra al polímero extractante. Para facilitar el paso de los analitos a la fibra, se puede agitar la muestra para que éstos se desplacen desde el centro de la muestra a las proximidades de la fibra.

Este modo de extracción se suele utilizar con analitos poco volátiles.

*B) Extracción en espacio de cabeza.*

En este caso los analitos son extraídos de la fase gas en equilibrio con la muestra líquida. Para ello, las muestras deben estar contenidas en viales herméticamente cerrados.

Con esta modificación se consigue proteger la fibra de los efectos nocivos producidos por sustancias no volátiles presentes en la matriz de la muestra. Además se puede modificar la matriz sin afectar a la fibra, incluyendo el ajuste del pH o la adición de sal.

La extracción de compuestos volátiles será más rápida en espacio de cabeza que en inmersión, ya que los coeficientes de difusión en la fase gas son varios órdenes de magnitud superiores que en la fase líquida. Este modo se suele emplear con analitos con volatilidad alta presentes en matrices complejas.

Para compuestos semivolátiles es necesario acelerar el paso de la matriz al espacio de cabeza, utilizando agitación o aumentando la temperatura de extracción.

#### *C) Extracción con membrana de protección.*

La fibra se expone a la muestra recubierta por una membrana selectiva que permite el paso de los analitos de interés a su través, mientras impide el paso de las interferencias.

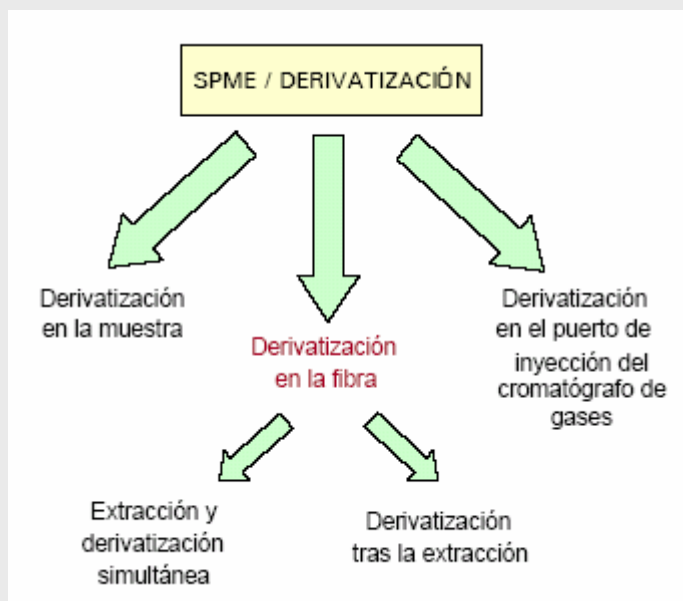
La principal razón del uso de la membrana es la protección de la fibra de sustancias que puedan dañarla, aunque el proceso de extracción es más lento porque los analitos necesitan difundir a través de la membrana para llegar a la fibra. Usando membranas delgadas y aumentando la temperatura de extracción se puede acelerar el proceso.

Este modo se emplea para extraer analitos poco volátiles de muestras complejas<sup>6</sup>.

Además de los tres modos de extracción expuestos, cabe la posibilidad de establecer otros modos de extracción, como el combinar un paso de derivatización con el proceso de microextracción. Esto resulta especialmente útil en el caso de realizar el análisis de compuestos polares mediante cromatografía de gases.

Las distintas combinaciones posibles entre la SPME y la derivatización se resumen en la **Figura II.4.1.3.2.**

Figura II.4.1.3.2. Posibles combinaciones de la SPME/derivatización.



(A) *Derivatización en la muestra (in situ).*

La derivatización tiene lugar en la propia muestra, normalmente acuosa. El agente derivatizante es adicionado directamente al vial que contiene la muestra, produciéndose la reacción de derivatización. Los derivados formados se extraen con la fibra de SPME y son introducidos en el equipo de medida para el análisis<sup>21-23</sup>.

(B) *Derivatización sobre la fibra de SPME.*

Existen dos posibilidades básicas para su realización.

En la primera de ellas, el agente derivatizante se ha incorporado en el recubrimiento de la fibra, previamente a su exposición a la muestra, produciéndose la extracción y la derivatización de los analitos simultáneamente<sup>24,25</sup>. En este caso, el derivatizante tiene que poseer una gran afinidad por el recubrimiento de la fibra y una baja presión de vapor, con el fin de asegurar su permanencia en la fibra durante la etapa de concentración<sup>26</sup>.

Una segunda posibilidad, es aquella en la que primero se extraen los analitos sobre la fibra y luego se derivatizan en la misma, al exponerla al espacio de cabeza de un vial que contiene el derivatizante<sup>27,28</sup>.

*(C) Derivatización en el puerto de inyección.*

La derivatización tiene lugar en el inyector del cromatógrafo de gases cuando los analitos y el reactivo derivatizante presentes en la fibra se someten a altas temperaturas. Por tanto, los compuestos son desorbidos y derivatizados simultáneamente<sup>26</sup>.

Cuando la derivatización se realiza antes o durante la extracción se puede incrementar la afinidad de los compuestos por la fibra, mientras que si se realiza después de la microextracción, tiene como único objetivo mejorar la calidad de las separaciones cromatográficas.

## **II.4.2. FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA MICROEXTRACCIÓN**

El proceso de microextracción está gobernado por diferentes factores, incluidos bajo dos aspectos fundamentales, los aspectos termodinámicos y los aspecto cinéticos.

### **II.4.2.1. Aspectos termodinámicos**

La SPME puede describirse como un proceso de reparto entre fases<sup>2,6,19,29,30</sup>.

En principio, aplicar un modelo matemático para describir el proceso de extracción resulta bastante complejo, ya que deberían incluirse todos los repartos existentes en el sistema, como la posible adsorción sobre partículas sólidas en suspensión o sobre las paredes del recipiente de la muestra. Además, dependiendo del tipo de fibra considerado se podrán

producir, tanto absorción como fenómenos de adsorción, lo que dificulta todavía más el desarrollo.

Para simplificar el sistema, se suelen considerar sólo los fenómenos de absorción y la existencia de tres únicas fases; la fase gaseosa o espacio de cabeza, la matriz de la muestra y el recubrimiento polimérico de la fibra.

Durante la extracción, los analitos se van a distribuir entre estas tres fases hasta alcanzar el equilibrio. Dado que la masa total de un analito debe permanecer constante durante la extracción, se puede plantear el siguiente balance de materia:

$$C_0.V_s = C_f^{\infty}.V_f + C_h^{\infty}.V_h + C_s^{\infty}.V_s \quad \text{Ecuación II.4.2.1.1}$$

En donde,  $C_0$  es la concentración inicial del analito en la muestra,  $C_f^{\infty}$ ,  $C_h^{\infty}$  y  $C_s^{\infty}$  son las concentraciones de equilibrio del analito en la fibra, en el espacio de cabeza y en la muestra, respectivamente, y  $V_f$ ,  $V_h$  y  $V_s$  son los volúmenes de la fibra, del espacio de cabeza y de la muestra, respectivamente<sup>29</sup>.

Si definimos la constante de distribución entre la fase gaseosa y la fibra como:

$$K_{fh} = C_f^{\infty} / C_h^{\infty}$$

y entre el espacio de cabeza y la matriz como:

$$K_{hs} = C_h^{\infty} / C_s^{\infty}$$

El número de moles del analito adsorbidos por la fibra ( $n = C_f^{\infty}.V_f$ ), puede expresarse de la siguiente forma:

$$n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f C_0 V_s}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Ecuación II.4.2.1.2}$$

En el equilibrio los potenciales de las tres fases son iguales, y la constante de distribución del analito entre la fibra y la disolución puede expresarse como:

$$K_{fs} = K_{fh} \cdot K_{hs} \quad \text{Ecuación II.4.2.1.3}$$

Al sustituir en la ecuación (2) se obtiene la siguiente expresión:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Ecuación II.4.2.1.4}$$

De la ecuación se deduce que la cantidad de analito extraída es independiente de la localización de la fibra en el sistema, como se esperaba para las condiciones de equilibrio. Así para muestras líquidas la cantidad de analito extraída por la fibra no va a depender de si la fibra se encuentra en la fase líquida o en la fase gas, por lo que, la sensibilidad de la extracción directa es la misma que la de la extracción en espacio de cabeza, siempre y cuando, los volúmenes de las distintas fases se mantengan iguales en los dos tipos de muestreo.

Si no existe espacio de cabeza (el vial que contiene la muestra está completamente lleno) el término  $K_{hs} \cdot V_h$  (capacidad del espacio de cabeza) se puede eliminar quedando la ecuación expresada de la siguiente forma:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad \text{Ecuación II.4.2.1.5}$$

Esta ecuación expresa los moles adsorbidos por la fibra al alcanzar el equilibrio.

Según lo expuesto en las ecuaciones **Ecuación II.4.2.1.4** y **Ecuación II.4.2.1.5** para cualquier proceso de SPME al alcanzar el equilibrio existe una relación directa entre la cantidad extraída de analito y su concentración inicial, independientemente del número de fases del sistema.

Es importante indicar que esto también se va a cumplir aunque no se haya alcanzado la situación de equilibrio termodinámico, siempre y cuando se mantenga el tiempo de extracción constante (ver apartado siguiente).

En algunas de las determinaciones puede ocurrir que  $K_{fs} \cdot V_f \ll V_s$ , es decir, que la capacidad de la fibra sea mucho menor que el volumen de muestra, por lo que se puede considerar despreciable. En estos casos se llega a la **Ecuación II.4.2.1.6**.

$$n = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \quad \text{Ecuación II.4.2.1.6}$$



De esta ecuación se deduce que la cantidad de analito extraída es independiente del volumen de muestra. En estas condiciones se dice que se ha alcanzado el volumen infinito lo cual va a permitir simplificar enormemente los cálculos. Esta aproximación no es válida en el caso en que los analitos a determinar tengan valores de  $K_{fs}$  muy elevados (gran afinidad por la fibra) y se estén utilizando volúmenes de muestra muy pequeños.

Los valores de  $K_{fs}$  van a estar influenciados por la selectividad del recubrimiento de la fibra por el analito, además de por otros factores como, la temperatura de muestreo, la fuerza iónica de la muestra, el pH o el contenido de materia orgánica disuelta.

El efecto de estos parámetros sobre la constante de distribución será discutido con detenimiento en el **Apartado II.4.3.**

#### II.4.2.2. Aspectos cinéticos

La velocidad del proceso de extracción va a venir definida por el tiempo de difusión de los analitos de la matriz de la muestra (o la fase gaseosa en HSSPME) a las cercanías de la fase polimérica, por la difusión en la propia fase y por la transferencia de masa entre las distintas interfaces existentes en el sistema. Por tanto, la etapa limitante del proceso puede estar constituida por cualquiera de estas etapas o la combinación de varias.

Como la mayor parte de la teoría del transporte de masa, la cinética de la SPME está basada en la 2ª Ley de Fick de difusión. La 2ª ley de Fick de difusión para el balance de masas en un sistema dinámico y para una dimensión puede ser expresada como:

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad \text{Ecuación II.4.2.2.1}$$

siendo: C la concentración, D el coeficiente de difusión del analito y x las dimensiones del sistema.

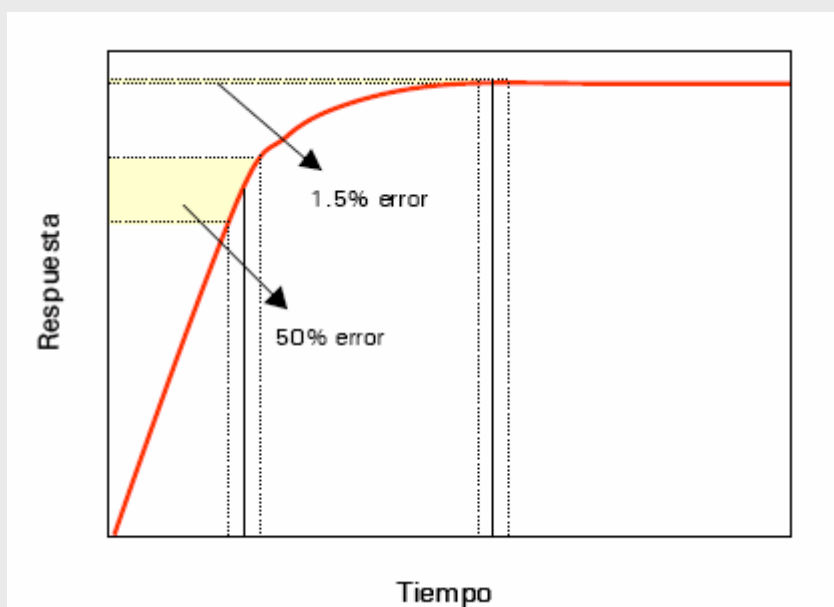
Despreciándose la interacción entre los analitos y factores como la expansión térmica, tal como se desprende de la **Ecuación II.4.2.2.1**, la cinética de extracción va a estar influenciada por parámetros geométricos, como el diámetro o forma del vial (viales con mayor diámetro suponen una mayor interfase o superficie de contacto entre la muestra y el espacio de cabeza), el espesor del recubrimiento polimérico (un mayor espesor ralentiza la extracción), y por las propias características del analito (peso molecular, polaridad, etc) que determinan su D.

La agitación de la muestra es uno de los factores que puede mejorar la difusión del analito en la muestra y, si esta es la etapa limitante del proceso, que se alcance antes el equilibrio.

De todas formas si es necesario un tiempo excesivamente largo para alcanzar condiciones de equilibrio, se puede trabajar bajo condiciones cinéticas aunque en este caso debe controlarse cuidadosamente el tiempo de extracción.

En la **Figura II.4.2.2.1** se representa el error cometido para la misma variación en el tiempo de extracción si se trabaja en equilibrio o en condiciones cinéticas. Tal como puede verse el error en la respuesta es más de 20 veces mayor si se trabaja en condiciones cinéticas, de ahí la importancia en la precisión de la medida del tiempo de extracción.

**Figura II.4.2.2.1.** Efecto de la variación del tiempo de extracción en la cantidad de analito extraída.



### II.4.3. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN

#### II.4.3.1. RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO

Tal como se apuntaba en el apartado de aspectos termodinámicos, la constante de distribución del analito entre la fibra y la muestra ( $K_{fs}$ ) describe la capacidad y selectividad del recubrimiento por el analito frente a otros componentes de la matriz. Así, la naturaleza del recubrimiento va a ser el factor que determine la selectividad del método.

En este sentido, se deben considerar principalmente dos parámetros para la selección del tipo de recubrimiento a usar en la microextracción, la polaridad y el espesor o volumen de recubrimiento. En principio cuanto mayor es el volumen del recubrimiento mayor será la sensibilidad. Sin embargo un espesor demasiado grande retarda el tiempo necesario para que se complete la extracción. En cuanto a la polaridad, se dispone de una amplia gama de recubrimientos comerciales, algunos de los cuáles se han desarrollado para aplicaciones específicas.

En la **Tabla II.4.3.1.1** se adjuntan características y propiedades de algunos fases poliméricas para las fibras de SPME disponibles comercialmente<sup>30</sup>.

**Tabla II.4.3.1.1.** Características de las fibras disponibles comercialmente por Supelco®.

Material extractante	Espesor	T máx ( °C )	Vol. (µL)	Polaridad	Uso	Tipo
<b>PDMS</b>	100 µm	280	0.612	Apolar	GC/HPLC	No enlazada
	30 µm	280	0.132	Apolar	GC/HPLC	No enlazada
	7 µm	340	0.026	Apolar	GC/HPLC	Enlazada
<b>PDMS-DVB</b>	65 µm	270	0.357	Semipolar	GC	Parcialmente entrelazada
	50 µm	-	0.415	Semipolar	HPLC	
<b>Stable Flex* PDMS-DVB</b>	65 µm	-	-	Semipolar	GC	Altamente entrelazada
<b>CAR-PDMS</b>	75 µm	340	0.436	Semipolar	GC	Parcialmente entrelazada
<b>Stable Flex CAR-PDMS</b>	85 µm	-	-	Semipolar	GC	Altamente entrelazada
<b>CW-DVB</b>	65 µm	260	0.357	Polar	GC	Altamente entrelazada
<b>Stable Flex CW-DVB</b>	70 µm	-	-	Polar	HPLC	Altamente entrelazada
<b>CW-TPR</b>	50 µm	-	0.330	Polar	HPLC	Parcialmente entrelazada
<b>Stable Flex DVB-CAR-PDMS</b>	50/30	270	-	Semipolar	GC	Altamente entrelazada
<b>PA</b>	85 µm	320	0.521	Polar	GC/HPLC	Parcialmente entrelazada

\* el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible

#### II.4.3.1.1. Recubrimientos homogéneos

Los más importantes de este grupo son el polidimetilsiloxano (PDMS) y el poliácrlato (PA).

Los recubrimientos de **PDMS** son los más utilizados, ya que fueron de los primeros en comercializarse. Son los más adecuados para los analitos apolares aunque, en algunos casos, también pueden ser usados para la determinación de analitos con cierta polaridad. Las fibras de PDMS se comercializan en diferentes espesores (100  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$  y 7  $\mu\text{m}$ ).

El tratarse de un polímero líquido, la extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a fenómenos de absorción<sup>31,32</sup> aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunos analitos (sobre todo si son muy apolares) puede realizarse vía adsorción ya que existe una cierta competitividad entre ambos efectos<sup>33-36</sup>.

Las fibras de **PA**, en cambio, son adecuadas para analitos polares y, aunque el recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos por la fibra al igual que en las fibras de PDMS<sup>31,37</sup>.

Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que poseen los analitos en las fibras de PDMS por lo que en general los tiempos de extracción son mayores.

A pesar de su resistencia a los disolventes, las fibras de PA pueden oxidarse fácilmente cuando se exponen a temperaturas mayores de 280°C. Temperaturas de ese orden son las que se requieren para desorber los analitos en el inyector de un cromatógrafo de gases, por lo que la corriente de gas ha de estar libre de oxígeno para evitar que la fibra se oxide y no pueda utilizarse de nuevo.

#### **II.4.3.1.2. Recubrimientos heterogéneos**

Los recubrimientos de este tipo se caracterizan por estar constituidos por una fase polimérica líquida con partículas porosas embebidas en su interior. Los poros ofrecen una mayor capacidad de adsorción de los analitos, reteniéndolos además físicamente. Así, la cantidad de analito extraída variará en función de su tamaño con la dimensión del poro.

La principal desventaja de estos polímeros comparados a los homogéneos es que ofrecen un rango lineal dinámico más pequeño<sup>6</sup>.

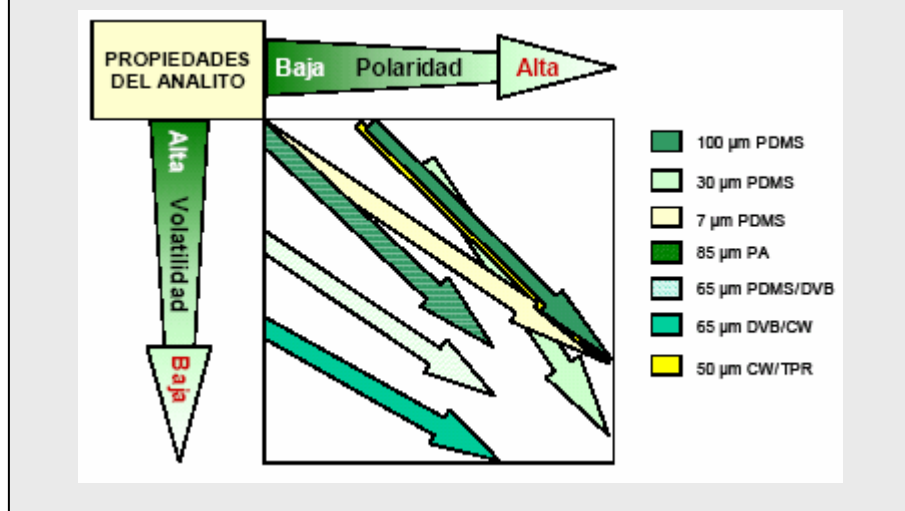
Entre estos recubrimientos se encuentran:

- **Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB).** Se trata de una mezcla de partículas porosas de DVB suspendidas en la fase líquida PDMS. El DVB posee principalmente poros de tamaño medio. Los mesoporos son ideales para retener analitos de  $C_6$ - $C_{15}$ . La combinación de estas dos fases proporciona una mejor retención de analitos más pequeños que con el PDMS solo, además de presentar cierta afinidad por los analitos polares.
- **Polidimetilsiloxano/Carboxen (PDMS/CAR)** Cuando el CAR se mezcla con el PDMS se crea una fase bipolar. El Carboxen contiene micro, meso y macroporos, y gracias a sus microporos puede extraer moléculas muy pequeñas. Es ideal para extraer moléculas de  $C_2$ - $C_{12}$ . Sin embargo, para las moléculas de más de 12 C la desorción es más lenta, generalmente por fenómenos de histéresis (condensación del analito en los macroporos). Para minimizar este efecto se deben usar temperaturas altas de desorción.
- **Carbowax/Resina templada (CW-TPR)** La fibra está formada por una suspensión de resina templada (TRP), esferas de alta pureza, sobre CW. La naturaleza polar de CW combinada con la TPR, hace a la fibra eficiente en la extracción de grandes moléculas polares. Esta fibra ha sido especialmente diseñada para aplicaciones como fase para acoplamiento con HPLC.
- **Carbowax/divinilbenceno (CW-DVB).** El CW es relativamente polar, pero cuando se combina con DVB su polaridad se incrementa, por lo que es la fibra más adecuada para extraer analito polares. La principal limitación que presenta es que es un recubrimiento frágil que puede desprenderse de la fibra, por ello han de tomarse precauciones necesarias para su protección, por ejemplo adicionando agentes entrelazantes que le confieren mayor estabilidad. El Carbowax también es sensible a la oxidación, por lo que la fibra debe preservarse de la luz y aislarse.

En la **Figura II.4.3.1.1** se observan los principales criterios que se pueden utilizar a la hora de seleccionar la fibra más adecuada en función de las propiedades de volatilidad y polaridad de los analitos.

El efecto de la polaridad de las fibras se ha demostrado en diversos estudios que comparan fibras para la extracción de compuestos polares<sup>38,39</sup>. No obstante, la polaridad de la fibra muestra un efecto mínimo en la extracción de moléculas de bajo peso molecular<sup>40</sup>. Parece que, en la extracción de moléculas pequeñas, la porosidad y el espesor de la fibra influyen más que la polaridad<sup>41</sup>.

**Figura II.4.3.1.1.** Guía de selección de las fibras de SPME en función de las propiedades del analito.



#### II.4.3.2. OTROS FACTORES IMPORTANTES

En este apartado se incluyen principalmente las condiciones que afectan a las constantes de distribución que intervienen en el proceso de microextracción ( $K_{fs}$  y  $K_{hs}$ ).

Entre ellas se encuentran:

⇒ **La temperatura de extracción.**

Va a influir tanto en los aspectos termodinámicos como cinéticos del proceso.

Los coeficientes de difusión de los analitos aumentan al incrementar la temperatura, por lo que se acelera la cinética de extracción y aumenta la cantidad de analito extraída. En HS-SPME, además, al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos en el espacio de cabeza (se incrementan las presiones de vapor) por lo que la extracción es también más rápida. Sin embargo, bajo condiciones de equilibrio, el proceso de microextracción es exotérmico, tal como se deriva de la ecuación; por lo que, el aumento de temperatura provoca una disminución del  $K_{fs}$ , resultando en una disminución de la cantidad de analito extraída en el equilibrio<sup>30</sup>.

$$K_{fs} = K_o \exp \frac{-\Delta H}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_o} \right) \quad (\text{Ecuación II.4.3.2.1})$$

$K_o$  es la constante de distribución cuando la fibra y la muestra están a  $T_o$ ,  $\Delta H$  es el cambio en la entalpía del analito cuando va de la muestra a la fibra,  $R$  es la constante de los gases.

Este efecto debe considerarse en la optimización del tiempo de extracción para un recubrimiento dado. En general debe usarse la temperatura más alta que provoque una sensibilidad satisfactoria y no alargue el análisis.

⇒ **El volumen de las fases.**

La sensibilidad del método de SPME es proporcional a la cantidad de analito extraída de la muestra ( $n$ ) que viene determinada por la **Ecuación II.4.2.1.3**.

Tal como se indica en la ecuación, la cantidad de analito extraída se incrementa al aumentar el volumen de la muestra  $V_s$  y disminuir el volumen de la fase gaseosa  $V_{hs}$ .

Si el volumen de muestra es mucho mayor que el producto  $K_{fs} \cdot V_f$ , en este caso,  $n$  no depende del volumen. En consecuencia, el uso de volúmenes de muestra mayores del volumen infinito no afectará a la sensibilidad del método pero sí puede mejorar la precisión.

⇒ **La adición de sal.**

Puede aumentar o disminuir la cantidad de analito extraída dependiendo del compuesto y la concentración de sal.

La adición de sal afecta a la partición de los analitos por que varía la fuerza iónica de la solución. Con especies moleculares al añadir sal se disminuye su solubilidad en la matriz acuosa (el agua solvata a los iones de la sal en lugar del analito) y favorece la extracción por la fibra. Con especies iónicas, disminuye la cantidad de analito extraída ya que aumenta el coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica.

⇒ **El pH.**

Asumiendo que solo las formas neutras pueden ser extraídas por el recubrimiento de la fibra, es necesario seleccionar el pH adecuado para mejorar la sensibilidad de la extracción.

Para ello, el pH debe estar dos unidades por debajo del  $pK_a$  de los analitos ácidos y dos unidades por encima para los básicos, que asegura que estén en su forma molecular. El pH además debe estar comprendido en el rango de trabajo recomendado para cada tipo de fibra.

⇒ **La agitación.**

El proceso de extracción es controlado por la difusión y la agitación promueve la difusión de los analitos a la fibra o de analitos volátiles al espacio de cabeza.

La efectividad de la técnica de agitación determina el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre fases.

La técnica de agitación más utilizada en los tres tipos de muestreos es la agitación magnética. Debe asegurarse un movimiento constante y homogéneo de la barra agitadora durante la extracción.

Otra forma de agitación es por la utilización de energía de ultrasonidos. Sin embargo, su desventaja es que calienta la muestra, además de ser ruidosa.

⇒ **La materia orgánica disuelta.**

Por lo general, disminuye la eficiencia de la extracción porque compite con los analitos orgánicos en la absorción por la fase polimérica de la fibra. Además la presencia de ciertas sustancias (sustancias húmicas) pueden dañar la fase polimérica al quedar retenidas de forma irreversible.

Para corregir este efecto matriz se pueden emplear patrones internos para corregir la respuesta, o agentes derivatizantes que mejora la afinidad de los analitos por la fibra.

⇒ **La presencia de disolventes orgánicos.**

Aunque en general la presencia de solventes orgánicos en muestras acuosas disminuye la cantidad de analito extraída ya que aumenta la solubilidad de los analitos en la muestra, en algunas ocasiones el proceso de extracción puede verse favorecido<sup>42</sup> debido a cambios en las interacciones entre la fibra y los analitos, o bien cuando se analizan muestras sólidas ya que la presencia de agua o de un solvente orgánico puede ayudar a la difusión de los analitos desde la matriz hasta la fibra<sup>43-45</sup>.



**II.4.3. FACTORES QUE AFECTAN A LA ETAPA DE DESORCIÓN**

La desorción térmica de los analitos en el inyector de un cromatógrafo de gases depende de la volatilidad de los analitos, de la posición de la fibra en el inyector, del espesor de la fibra, de la temperatura del inyector y del tiempo de exposición. A medida que aumenta la temperatura, los coeficientes de partición fibra/gas portador, disminuyen. Asimismo, disminuye rápidamente la capacidad de la fibra para retener los analitos. El flujo constante de gas portador en el inyector del cromatógrafo de gases facilita la liberación de los analitos. Por tanto, los parámetros a optimizar cuando la desorción se realiza térmicamente en un cromatógrafo de gases son:

⇒ **La temperatura de desorción.**

Como regla general se recomienda fijar como temperatura aquella que es la máxima recomendada por el fabricante de la fibra. Al aumentar la temperatura, la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos y arrastrados por la columna por el flujo del gas portador.

Normalmente, la temperatura óptima de desorción es aquella que coincide aproximadamente con la del punto de ebullición del analito menos volátil.

⇒ **Tiempo de desorción.**

Debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos sea completa y no queden restos en la fibra. Esto puede suceder si el tiempo o la temperatura de desorción no son suficientes para la desorción completa de los analitos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) R. P. Belardi; J. Pawliszyn, J. Water Pollut. Res. 24 (1989) 179.
- (2) Z. Zhang; J. Pawliszyn, J. Anal. Chem., 65 (1993) 1843.
- (3) D.W. Potter, J. Pawliszyn, Environ. Sci. Technol. 28 (1994) 298.
- (4) M. Llompart, K. Li, M. Finga, Anal. Chem. 70 (1998) 2510.
- (5) J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. Ed. Wiley-VCH, Nueva York (1997).
- (6) P. Brown, E. Grushka, Advances in Chromatography, Ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York, EEUU (1998).
- (7) L. Muller, T. Gorecki, J. Pawliszyn, Fresenius J. Anal. Chem., 364 (1999) 610.
- (8) J.A. Koziel, J. Noah, J. Pawliszyn, Environ. Sci. & Technol., 35 (2001) 1481.
- (9) Y.C. Chien, S.N. Uang, C.T. Kuo, T.S. Shih, J.F. Jen, Anal. Chim. Acta, 419 (2000) 73.
- (10) J.A. Koziel, M.Y. Jia, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 72 (2000) 5178.
- (11) R. Hyspler, S. Crhova, J. Gasparic, Z. Zadak, M. Cizkova, V. Balasova, J. Chromatogr. B, 739 (2000) 183.
- (12) C. Grote, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 69 (1997) 587.
- (13) A.C. Gerecke, C. Tixier, T. Bartels, R.P. Schwarzenbach, S.R. Muller, J. Chromatogr. A, 930 (2001) 9.
- (14) Y.C. Wu, S.D. Huang, Anal. Chem., 71 (1999) 310.
- (15) R. Aranda, R.C. Burk, J. Chromatogr. A, 829 (1998) 401.
- (16) S. Li, S.G. Weber, Anal. Chem., 69 (1997) 1217.
- (17) C.W. Wang, J. Pawliszyn, Anal. Comm., 35 (1998) 353.
- (18) A.-L. Nguyen, J.H.T. Luong, Anal. Chem., 69 (1997) 1726.

- (19) Z. Zhang, J. Poerschmann, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.*, 33 (1996) 219.
- (20) A. Handy, *Extraction Methods in Organic Analysis*, Ed. Sheffield Academic Press, Londres, Reino Unido (1999).
- (21) K. D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 160.
- (22) R. Rodil, A. M. Carro, R. A. Lorenzo, M. Abuín, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313.
- (23) M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela. *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 137.
- (24) R. Battle; A. Colmsjö; U. Nilsson, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 524.
- (25) E. H. M. Koster, C. H. P. Bruins, J. de Jong, *Analyst*, 127 (2002) 598.
- (26) H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 17.
- (27) P. Okeyo; S. M. Rentz; N. H. Snow, *J. High. Resol. Chromatogr.*, 20 (1997) 171.
- (28) C. Jurado; M. P. Giménez; T. Soriano; M. Menéndez; M. Repetto, *J. Analytical Toxicology*, 24 (2000) 11.
- (29) S. A. Scheppers Wercinski, *Solid Phase Microextraction. A Practical Guide*. Ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1999).
- (30) J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*, Ed. The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999).
- (31) T. Gorecki, X.M. Xu, J. Pawliszyn, *Analyst*, 124 (1999) 643.
- (32) R.E. Shirey, R.F. Mindrup, SPME adsorption versus absorption: which fiber is best for your application, Presentation at Pittcon, New Orleans, 2000.
- (33) E. Baltussen, P. Sandra, F. David, H-G. Janssen, C. Cramers, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5213.
- (34) J. Poerschman, T. Gorecki, F.D. Kopinke, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3824.
- (35) Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y. Liu, M.L. Lee, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1866.
- (36) W.H.J. Vaes, P. Mayer, A.G. Oomen, J.L.M. Hermens, J. Tolls, *Anal. Chem.* 72 (2000) 639.

- (37) W.H.J. Vaes, C. Hamwijk, E. Urresterazu Ramos, H.J.M. Verhaar, J.L.M. Hermens, Anal. Chem. 68 (1996) 4458.
- (38) P. Bartak, L. Cap, J.Chromatogr. A. 767 (1997) 171.
- (39) B. Hall, J. Brodbelt, J. Chromatogr. A. 777 (1997) 75.
- (40) R.E. Shirey, J. Chromatogr. Sci. 38 (2000) 109.
- (41) L. Pillonel, J.O. Bosset, R. Tabacchi, Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 35 (2002) 1.
- (42) M. Krogh, H. Grefslie, K.E. Rasmussen, J. Chromatogr. B 689 (1997) 357.
- (43) Z. Zhang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 67 (1995) 34.
- (44) M. Llompart, K. Li, M. Fingas, Talanta 48 (1999) 451.
- (45) R.A. Doong, P.L. Liao, J. Chromatogr. A 918 (2001) 177.

## II.5. NUEVAS APLICACIONES DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

Además de su aplicación en el desarrollo de metodología analítica, la SPME presenta aplicaciones en diferentes áreas de investigación, como en la estimación de la concentración biodisponible de un analito en diferentes matrices frente a la concentración total presente, es decir, la cantidad de analito que se encuentra libre en el entorno y al que pueden tener acceso los seres vivos<sup>1-8</sup>; en estudios biomiméticos, para predecir la posible acumulación de un analito en diferentes organismos y su toxicidad<sup>9</sup>; y en la determinación de los coeficientes de reparto de un analito entre la fase polimérica de una fibra y la matriz en la que se encuentre ( $K_{fs}$ )<sup>10-14</sup>. Siguiendo esta línea, se han publicado diferentes estudios en los que se intenta establecer una relación entre los coeficientes de partición  $K_{fs}$  en agua y los coeficientes de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ )<sup>15-17</sup>.

$K_{ow}$  se utiliza como parámetro de referencia para la estimación de la lipofilia de los compuestos químicos, y en relación directa, de la capacidad de bioacumulación de los mismos en los tejidos orgánicos, lo que resulta de vital importancia para conocer las diferentes rutas que puede tomar un contaminante al ser liberado al medioambiente.

Sin embargo, las técnicas disponibles para su determinación experimental, como los métodos basados en agitación lenta, son muy tediosas<sup>17-20</sup>, por lo que se suele recurrir a su determinación teórica a partir de otras propiedades físico-químicas conocidas, pero que en muchas ocasiones no ofrecen resultados ajustados a la realidad experimental.

En este sentido, la SPME podría constituir una alternativa sencilla para la determinación de la lipofilia de los compuestos, si se consiguiese demostrar una correlación entre  $K_{fs}$  y  $K_{ow}$ .

II.5.1. DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE MICROEXTRACCIÓN ( $K_{fs}$ )

## II.5.1.1. Cálculo de la cantidad de analito extraída por la fibra (n)

A partir de la **Ecuación II.4.2.1.5** que se introdujo en el capítulo anterior, se puede obtener la siguiente expresión para el cálculo de  $K_{fs}$ , en el caso de considerar un sistema de dos fases:

$$K_{fs} = \frac{nV_s}{V_f(C_oV_s - n)} \quad \text{Ecuación II.5.1.1.1}$$

En donde,  $C_o$  es la concentración inicial del analito en la muestra,  $n$  el número de moles del analito adsorbidos por la fibra, y  $V_f$ ,  $V_h$  y  $V_s$  son los volúmenes de la fibra, del espacio de cabeza y de la muestra, respectivamente.

De la **Ecuación II.5.1.1.1** se deduce que para el cálculo de  $K_{fs}$  es necesario conocer de forma exacta la cantidad extraída por la fibra ( $n$ ), ya que el resto de términos incluidos son conocidos.

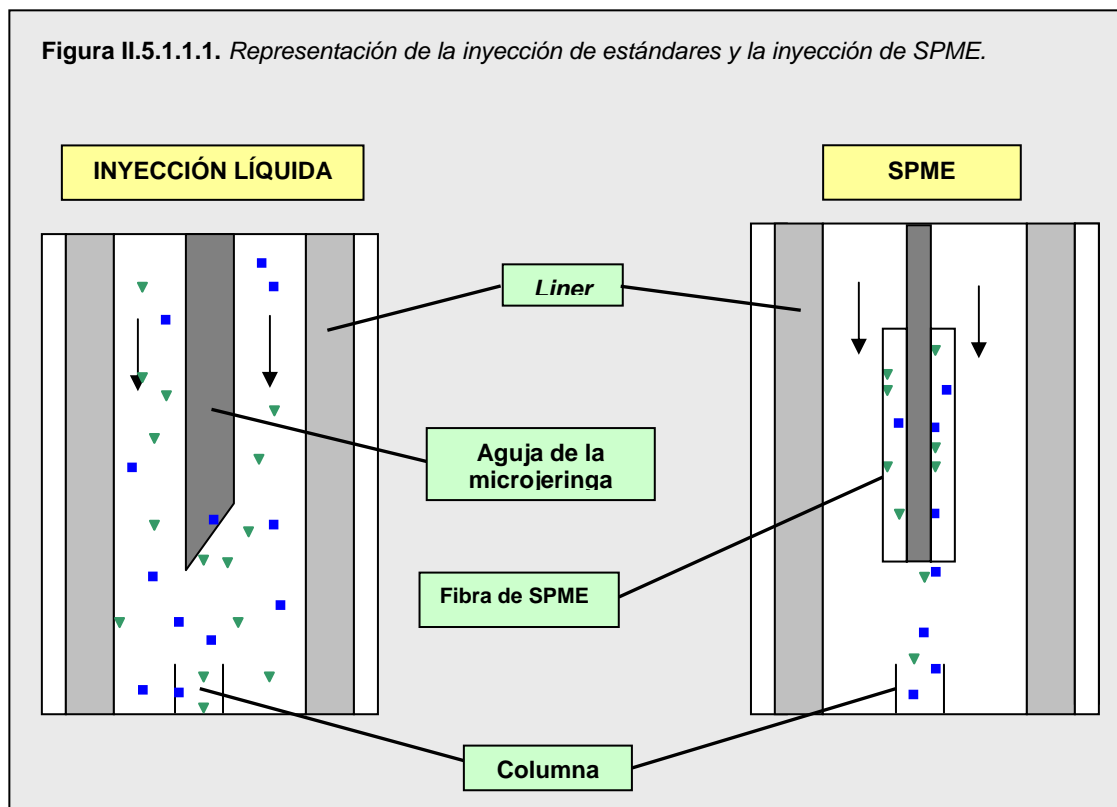
Para el cálculo de  $n$  normalmente se utiliza la inyección directa como método de calibración externa<sup>6,13,17,21</sup>. Para ello se relaciona el área de la señal obtenida en la inyección de la fibra con el área obtenida en la inyección directa de un determinado volumen (del orden de los  $\mu\text{L}$ ) de estándares de concentración exactamente conocida.

En este caso es necesario que la transferencia de masa hacia la columna cromatográfica, tanto en la inyección directa, como en la inyección de la fibra, sea completa. Sin embargo, la inyección directa está influenciada por diferentes factores como la expansión de volumen que se produce en la vaporización del disolvente, lo cual puede derivar en pérdidas del analito si no se optimiza el método de inyección<sup>22</sup>.

Por ejemplo, si se inyecta  $1\mu\text{L}$  de hexano en un inyector a  $200^\circ\text{C}$ , con una presión en cabeza de columna de  $70\text{ kPa}$ , su volumen como gas vaporizado es de  $177\mu\text{L}$ , para metanol es de  $360\mu\text{L}$  y, en el caso de agua, de casi  $1300\mu\text{L}$ . Si el volumen de gas vaporizado es mayor que el volumen del *liner*, en modo *splitless* se produce la salida de gas por la línea de purga del septum, con la consecuente pérdida de analitos.

En cambio, con SPME no se utiliza disolvente, por lo que los analitos son desorbidos térmicamente en el inyector y las pérdidas que puedan producirse serán menores.

En la **Figura II.5.1.1.1** se representa lo que ocurre durante la inyección líquida y la inyección de una fibra de SPME.



Este hecho dificulta la cuantificación, pudiendo dar lugar a resultados incorrectos si no se optimizan las condiciones de inyección. En este sentido, la configuración *on-column* para la inyección líquida es la que proporciona los mejores resultados<sup>23</sup>.

Una alternativa a la inyección directa para la cuantificación es la extracción múltiple.

Esta técnica se introdujo por primera vez para la determinación cuantitativa de compuestos orgánicos volátiles en matrices complejas para reducir las interferencias, mediante la inyección directa del espacio de cabeza en el cromatógrafo<sup>24</sup>.

Esta técnica de extracción múltiple también se puede utilizar para la cuantificación de SPME<sup>25-27</sup>.

La extracción múltiple consiste en realizar extracciones sucesivas del mismo vial. La concentración decae exponencialmente y, dependiendo de los  $K_{fs}$  de los compuestos, es posible extraer completamente la cantidad inicial de compuesto en la muestra tras un determinado número de extracciones.

La técnica ya ha sido empleada por Urruty y Montury en la determinación de los coeficientes de partición entre una muestra acuosa y la fibra de PDMS<sup>28</sup>, por Zimmerman et al.<sup>29</sup> y por Nardi mediante SPME *in-tube*<sup>30</sup>.

### II.5.1.2. Influencia del recubrimiento polimérico

Normalmente el cálculo de los coeficientes de distribución se lleva a cabo con recubrimientos poliméricos líquidos, como PDMS, en los que el proceso de reparto se produce por mecanismos de absorción.

Si se utiliza una fase extractante mixta (del tipo CW-DVB, PDMS-DVB o CAR-PDMS) se produce interacción por adsorción en la superficie de las partículas porosas del recubrimiento. Las superficies tienen un número limitado de posiciones activas debido a mecanismos competitivos y al impedimento estérico. En este caso la expresión para el coeficiente de reparto ( $K_{fs}$ ) no es totalmente correcta, debiendo tener en cuenta otros términos que incluyan los mecanismos de adsorción<sup>13</sup>.

El reparto de analito en la fibra de PDMS mediante absorción se demostró a partir de imágenes de microscopía fluorescente obtenidas en el estudio publicado por Mayer et al<sup>16</sup>.

En este caso, debería encontrarse siempre correlación entre  $\log K_{fs}$  y  $\log K_{ow}$ . Sin embargo, en numerosos estudios se encontraron problemas a la hora de correlacionar ambos parámetros, sobre todo al estudiar compuestos de peso molecular alto, como PCBs y PAHs<sup>7,11,12,15,17</sup>.

Estos resultados anómalos se debieron, en la mayoría de los casos, a unas malas condiciones experimentales, al no considerar posibles fenómenos de adsorción sobre las paredes del vial o las barras agitadoras, muy probables teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de estos compuestos (altos  $K_{ow}$  y baja solubilidad), y que pueden conducir a error a la hora de estimar la cantidad de analito extraída por la fibra<sup>11,31</sup>.



### II.5.1.3. Efecto de la mezcla de analitos

En la mayoría de los estudios en los que se pretende determinar  $K_{fs}$  se trabaja con mezclas de compuestos, en ocasiones, con propiedades muy diferentes.

En principio no debe encontrarse una desviación significativa entre el cálculo de  $K_{fs}$  para un analito individualmente o en una mezcla de compuestos, si se considera la fibra de PDMS ya que la absorción es un fenómeno no competitivo e independiente de la concentración<sup>7</sup>. Este hecho ha sido confirmado por Poerschmann y Gorecki en el estudio de PCBs<sup>32</sup>.

Sin embargo, otros autores como Paschke y Popp obtuvieron valores de  $K_{fs}$  para el compuesto individual mayores que con mezcla de diferentes compuestos, en el caso de pp'DDE y ciertos PCBs de alto peso molecular<sup>17</sup>.

La posible explicación de este resultado, según los autores, serían los efectos debidos a la presencia de otros solutos que afectan a la actividad de cada uno de los analitos presentes en la fase acuosa en diferente grado.

Este hecho podría relacionarse con la solubilidad de Hildebrand ( $\delta$ ), parámetro que mide la solubilidad de un analito en una fase orgánica.

Este concepto de solubilidad es importante para describir la partición del analito en fibras líquidas. Así, cuando se consideran analitos de distintas clases, que presentan distinta solubilidad en la fibra podrían encontrarse problemas al estimar  $K_{fs}$ .

### II.5.2. CORRELACIÓN ENTRE $K_{fs}$ y $K_{ow}$

Tal como se indicaba al inicio de esta Sección, en los últimos años se han publicado varios estudios intentando establecer una relación entre  $K_{fs}$  y  $K_{ow}$ , teniendo en cuenta que  $K_{ow}$  es una medida de la lipofilia de los compuestos y su potencial de bioacumulación.

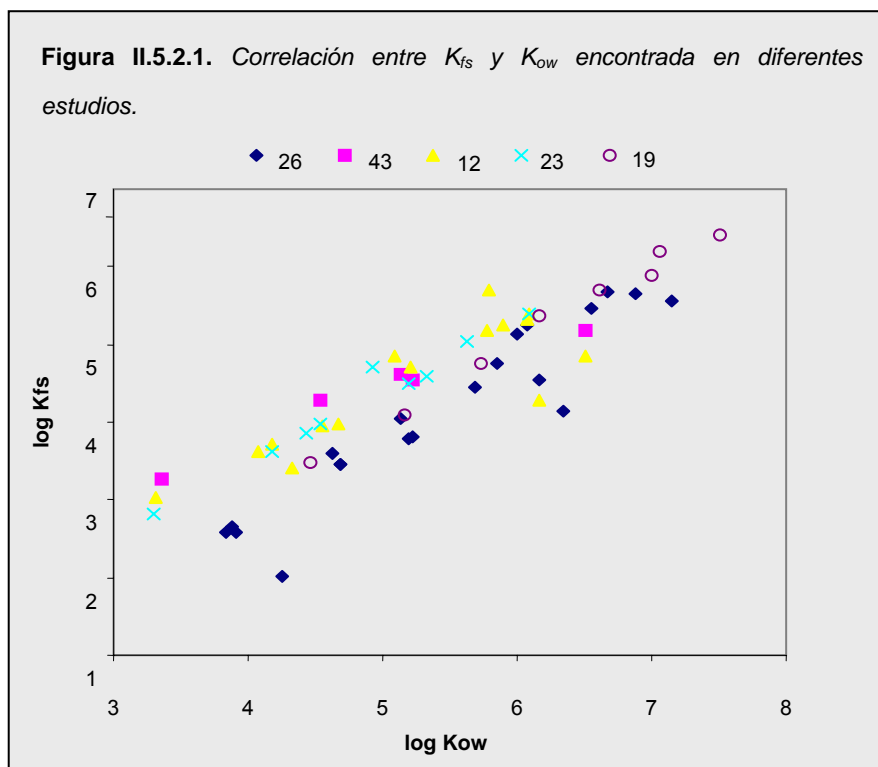
Existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos, algunos autores consiguen buena correlación en todo el rango de  $K_{ow}$ <sup>16</sup> o sólo cuando  $K_{ow} < 6^{7,12}$ ; mientras que otros presentan una mala correlación en todo el rango<sup>11,17</sup>.

Realmente todos los analitos deberían presentar correlación, independientemente del

valor de  $K_{ow}$ , por lo que algunos autores atribuyen esta pobre correlación para los compuestos más pesados a pérdidas por adsorción.

Estos estudios se llevan a cabo, en muchos casos, con mezclas complejas de analitos de varias clases en las que el rango de  $K_{ow}$  es amplio.

En la **Figura II.5.2.1** se comparan los datos obtenidos en diferentes estudios<sup>11,12,16,17,33</sup>



Ref. 11. Compuestos estudiados: PAHs. Fibra PDMS de 100  $\mu\text{m}$ .

Ref. 12. Compuestos estudiados: PAHs. Fibra PDMS de 100  $\mu\text{m}$ .

Ref. 16. Compuestos estudiados: PAHs, bencenos clorados, PCBs, pp'DDE. Fibra PDMS de 15  $\mu\text{m}$ .

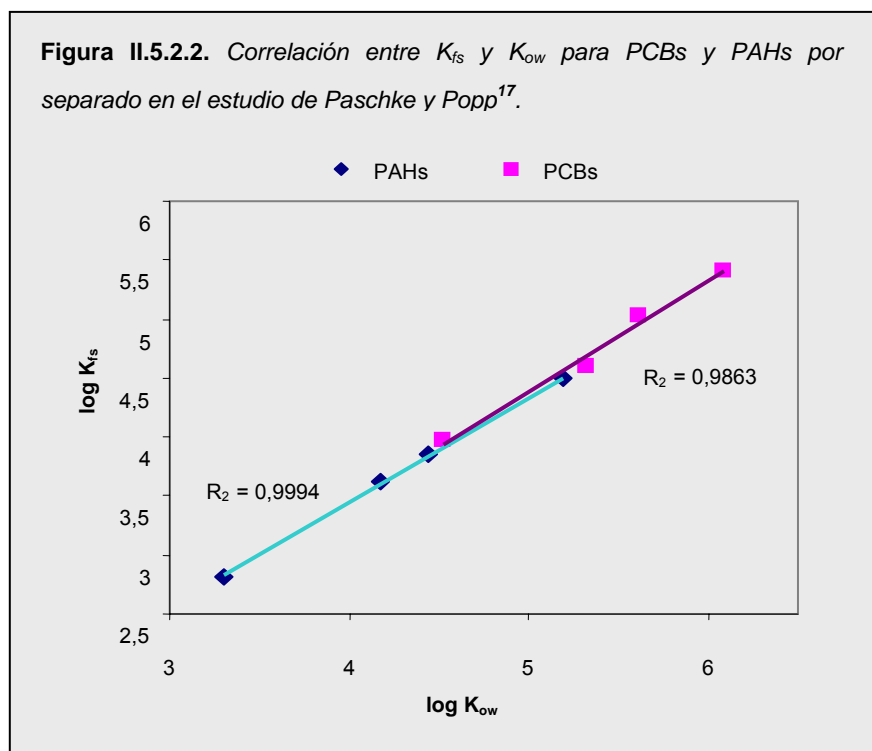
Ref. 17. Compuestos estudiados: alcanos, PAHs y PCBs. Fibra PDMS de 100  $\mu\text{m}$ .

Ref. 33. Compuestos estudiados: ciclohexanos clorados, bencenos clorados, PAHs, pp'DDE y PCBs. Fibra PDMS de 100  $\mu\text{m}$ .

Tal como se puede ver, en algunos estudios se produce una desviación progresiva de la correlación a medida que aumenta  $K_{ow}$ , y para valores de  $\log K_{ow} > 6$  se pierde la linealidad.

Para establecer esta correlación, la mayor parte de los autores hacen referencia a valores de  $K_{ow}$  previamente publicados. Sin embargo, existen grandes discrepancias entre los  $K_{ow}$  de diferentes estudios y su selección puede ser un factor determinante a la hora de obtener una buena correlación. Por ejemplo, para el 2-nitrofenol,  $\log K_{ow}$  varía entre 0.76 y 2.24, usando diferentes técnicas como HPLC y embudo de decantación<sup>34</sup>.

En el caso del estudio simultáneo de varias familias de compuestos, como el propuesto por Paschke y Popp<sup>17</sup> para PAHs y PCBs, la mala correlación obtenida podría justificarse debido a la interacción entre compuestos, tal como se indicaba en el **Apartado II.5.1.1.4**. De hecho, si se establece la correlación de las familias de compuestos de forma separada, la correlación mejora, tal como se confirma en la **Figura II.5.2.2**. Aunque lo más probable es que se produjesen pérdidas por adsorción.



En definitiva, los estudios publicados hasta la fecha intentando establecer una correlación entre  $K_{fs}$  y  $K_{ow}$ , no han sido del todo correctos, en gran medida debido a errores de tipo experimental, por lo que es necesario proponer métodos alternativos para la determinación de  $K_{fs}$  que permitan eliminar estos problemas.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) P. Mayer, Partitioning based approaches to study exposure and effects of hydrophobic organic substances, Tesis Doctoral, Universidad de Utrecht, Holanda, Junio 2000.
- (2) S. Lee, J. Gan, W.P. Liu, M.A. Anderson, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 5597.
- (3) E.U. Ramos, S.N. Meijer, W.H.J. Vaes, H.J.M. Verhaar, J.L.M. Hermens, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 3430.
- (4) D. Lambropoulou, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A 952 (2002) 215.
- (5) W. Chen, K.F. Poon, H.W. Lam, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 3816.
- (6) R.U. Holt, J. Chromatogr. A 937 (2001) 107.
- (7) J. Hall, M. Satterfield-Doerr, R. Parikh, S. Brodbelt, Anal. Chem. 70 (1998) 1788.
- (8) B.I. Escher, M. Berg, J. Mühlemann, M.A.A. Schwarz, L.M. Hermens, W.H.J. Vaes, R.P. Schwarsenbach, Analyst 127 (2002) 42.
- (9) P.A. Martos, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 69 (1997) 402.
- (10) P. Pollien, D. Roberts, J. Chromatogr. A 864 (1999) 183.
- (11) B. Shurmer, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 72 (2000) 3660.
- (12) R. Doong, S.M. Chan, Anal. Chem. 72 (2000) 3467.
- (13) I. Valor, M. Pérez, C. Cortada, D. Apraiz, J.C. Molto, G. Font, J. Sep. Sci. 24 (2001) 39.
- (14) E.Y. Zeng, D. Tsukada, J.A. Noblet, J. Peng, J. Chromatogr. A 1066 (2005) 165.
- (15) Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y. Liu, M.L. Lee, Anal. Chem. 70 (1998) 1866.
- (16) P. Mayer, W.H.J. Vaes, J.L.M. Hermens, Anal. Chem. 72 (2000) 459.
- (17) A. Paschke, P. Popp, J. Chromatogr. A 999 (2003) 35.
- (18) J.H.M. de Bruijn, F. Busser, W. Seinen, J. Hermens, Environ. Toxicol. Chem. 8 (1989) 499.
- (19) A.G. van Haelst, P.F. Hessen, F.W.N. van der Wielen, H.A.J. Govers, Chemosphere 29 (1994) 1651.

- (20) E. Braekevelt, S.A. Titlemier, G.T. Tomy, *Chemosphere* 51 (2003) 563.
- (21) J. Dugay, C. Miede, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 27.
- (22) K. Grob, *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- (23) G. Ouyang, Y. Chen, L. Setkova, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 9.
- (24) S. Kolb, *Chromatographia* 15 (1982) 587.
- (25) O. Ezquerro, B. Pons, M.T. Pena, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 247.
- (26) Z. Penton, SPME, Application Note 17, Varian, Bellefonte, PA, 1995.
- (27) D. de la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzar, C. Hurlbeck, C. Bartsch, K.H. Feller, *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 784.
- (28) L. Urruty, M. Montury, *J. Chromatogr. Sci.* 37 (1999) 277.
- (29) T. Zimmermann, W.J. Ensinger, T.C. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 51.
- (30) L. Nardi, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 39.
- (31) E. Baltussen, S. Pat, D. Frank, H.G. Janssen, C. Cramers, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5213.
- (32) J. Poerschmann, T. Górecki, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3824.
- (33) J. Poerschmann, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 603.
- (34) J.R. Dean, W.R. Tomlinson, V. Makowskaya, R. Cumming, M. Hetheridge, M. Comber, *Anal. Chem.* 68 (1996) 130.



## II.6. QUIMIOMETRÍA APLICADA AL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Toda investigación en el campo de la química analítica, y en concreto en el área medioambiental, debería comenzar preguntándose cuáles son los parámetros determinantes en el proceso estudiado, de qué forma le afectan, y en caso de ser posible, la obtención de algún modelo que permita relacionar el comportamiento observado con las condiciones estudiadas<sup>1</sup>.

Tal como se describió en el **Apartado II.4.3**, son muchas las variables que influyen en el proceso de microextracción; por tanto, es evidente que la labor de optimización de un método de determinación basado en la SPME puede convertirse en proceso complejo y tedioso si no se recurre a herramientas quimiométricas.

Así, en los diferentes métodos abordados en esta memoria de Tesis, se han considerado los siguientes aspectos de la quimiometría, con el objetivo de resolver los problemas encontrados de la manera más sencilla y simple posible, pero obteniendo conclusiones fiables.

Estos aspectos son:

- la planificación y diseño de experimentos para la optimización de los procedimientos de microextracción para cada familia de compuestos considerados
- la evaluación de la calidad de los métodos propuestos.

### II.6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN

El diseño experimental se utiliza para la identificación de los factores que pueden influir en el resultado de un experimento, empleando el análisis estadístico para separar y evaluar los efectos de los factores implicados, y determinar los valores de los factores que proporcionan una mayor respuesta, en nuestro caso una mayor eficacia del proceso de microextracción<sup>1,2,3</sup>. El número de experimentos que se necesitan para alcanzar estos objetivos es normalmente inferior al que se necesitaría si se utilizara la aproximación tradicional en la cual se estudia la influencia de cada factor individualmente; además, la información obtenida es más completa.

En el diseño de experimentos, se denomina como factores a las variables o a cualquier aspecto de las condiciones experimentales que producen una variación en el fenómeno estudiado. Los diferentes valores que puede tomar un factor se conocen como niveles. El efecto de un factor es la variación de la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor, y a esta variación se le denomina efecto principal<sup>2</sup>.

En algunos experimentos, podemos encontrar que la diferencia de respuesta entre los niveles de un factor, no es la misma para todos los niveles de otro factor. Cuando esto ocurre, se produce una interacción entre los factores. La determinación de interacciones puede llegar a ser muy importante en la optimización del proceso, y no se podrían evaluar si estudiáramos cada factor por separado.

Dentro de los diseños experimentales, los diseños de cribado de factores (*Screening Designs*) son los más utilizados. Éstos consisten en investigar cuales, de todos los factores potencialmente influyentes, lo son en el campo experimental fijado. Dentro de estos diseños tenemos los diseños factoriales completos y fraccionados<sup>1</sup>.

En el diseño factorial completo, se incluyen medidas de respuesta para todas las combinaciones posibles de factores a todos los niveles. N factores y k niveles incluyen  $k^N$  experimentos.

En el diseño factorial reducido, los factores pueden ser evaluados usando una pequeña fracción de experimentos, suponiendo que sean despreciables las interacciones de segundo orden y superiores. El diseño factorial fraccional viene dado por  $k^{N-P}$  experimentos, donde P es siempre menor que N.

Los diseños de cribado de factores normalmente se aplican a dos niveles ( $k=2$ ) y los experimentos propuestos por la matriz experimental, deben ser diferentes para evitar información replicada. Además dependiendo de su resolución se puede obtener una mayor o menor definición de la información obtenida.



La resolución de un diseño determina el grado de confusión entre factores, de modo que no se pueden separar sus efectos. Así, tenemos:

1. Diseño de resolución R=III: no confunde los efectos principales entre sí, pero los confunde con las interacciones de dos factores.
2. Diseño de resolución R=IV: no confunde los efectos principales con las interacciones de dos factores, pero confunde las interacciones de dos factores entre sí.
3. Diseño de resolución R=V: no confunde los efectos principales con las interacciones de dos factores, pero confunde las interacciones de dos factores con las de tres factores, etc.

Otra limitación que presenta este tipo de diseños, es que al incluir sólo dos niveles, no se puede estudiar el intervalo completo de niveles posible de los factores.

Esto se puede lograr empleando los diseños multifactoriales categóricos (*Multifactor Categorical Designs*), en los cuales los factores puede variarse en un rango de más de dos niveles. En este caso, el diseño se define como  $N \times k_N$ , donde  $k_N$  son los niveles considerados para cada factor.

Por otro lado, a la hora de decantarnos por uno u otro diseño, es importante definir los grados de libertad (d.f.) disponibles para evaluar el error. Los grados de libertad del error son necesarios para comprobar el nivel de significación de los efectos de los factores. Si no se tienen puntos centrales y si se quieren estimar todos los efectos principales y las interacciones entre dos factores, es imprescindible disponer de grados de libertad suficientes.

Dada la complejidad de los cálculos matemáticos necesarios para la aplicación de los diseños descritos, resulta indispensable el uso de programas estadísticos especializados. Dentro de estos se encuentra el programa *Statgraphics-Plus*<sup>®</sup>, que permite entre otras opciones, realizar contrastes de significación, diseños experimentales de diferentes tipos, métodos de control de calidad, etc<sup>4</sup>.

La aplicación de este programa para la optimización de procesos mediante diseño factorial presenta las siguientes opciones estadísticas con sus correspondientes representaciones gráficas.

(A) Opciones estadísticas:

#### Cálculo de efectos

Se calculan los efectos estimados para las variables respuesta. El sistema define el efecto de un factor como el promedio de las respuestas para el nivel más alto de un factor menos el promedio de las respuestas para el nivel más bajo. Además, se puede seleccionar el máximo orden de efectos, para especificar cuales son los efectos que queremos que el sistema estime. Con un orden igual a 1, se estiman sólo los efectos principales, mientras que con un orden igual a 2 se consideran también las interacciones entre factores.

#### Análisis de varianza (ANOVA)

El ANOVA descompone la variabilidad de cada compuesto en las distintas contribuciones debidas a los factores e interacciones estudiadas. Proporciona también, el valor de la constante F y los valores de p para esta constante, que nos indica el nivel de significación estadística para cada factor.

#### Test de rango múltiple

Se aplica un proceso de comparación múltiple para determinar cual de las medias para cada nivel de un factor determinado, es significativamente distinta a las otras. Por una parte, se calcula la diferencia estimada entre cada par de medias, y se indica si ese par presenta una diferencia estadísticamente significativa para un nivel de confianza determinado, y por otra, se identifican los grupos de niveles homogéneos, es decir, entre las cuales no existen diferencias estadísticamente significativas.

(B) Opciones gráficas:

#### Cartas Pareto

Se trata de la representación de los resultados del cálculo de efectos. En este tipo de gráficos, se representa cada factor mediante una barra horizontal que posee una longitud proporcional al valor absoluto del efecto estimado frente al error estándar. Mediante una línea vertical se define el límite de significación y los factores cuya barra supere la línea se consideran significativos a ese nivel de confianza.

#### Gráficas de efectos principales

Gráfica donde se representan los efectos principales mediante líneas. Cuando el signo de la pendiente es positivo, la respuesta aumenta al pasar del nivel más bajo al nivel más alto

del factor, si el signo es negativo, disminuye. Cuanto mayor sea la línea y la pendiente, mayor será la influencia del factor sobre la respuesta.

#### Gráficas de interacciones

Reflejan la variación de la respuesta teniendo en cuenta dos factores, por lo que, observando estas gráficas, se puede saber si existen interacciones entre los factores, es decir, si un factor ejerce diferente efecto dependiendo del nivel del otro factor.

Para poder interpretar estas gráficas, se observa si existen cruces entre las líneas y las pendientes de las líneas.

#### Superficies de respuesta

Tienen el mismo significado que las gráficas de interacciones, pero representado en tres dimensiones.

La utilización de uno u otro diseño, así como la elección de las opciones estadísticas y gráficas para cada uno de ellos, dependerá de las características de cada grupo de contaminantes estudiado y se analizará en detalle en los apartados correspondientes del Capítulo de Resultados y Discusión.

### **II.6.2 VALIDACIÓN**

La validación de un método analítico consiste en la determinación de las características de funcionamiento del mismo y en la comprobación de que éstas son adecuadas a la aplicación que se le quiere dar<sup>5,6,7,8</sup>. Por tanto, la validación abarca dos aspectos fundamentales, que son:

- la evaluación de los parámetros de calidad del método.
- la adecuación de estos a unos requerimientos analíticos concretos.

Tal como se indicaba al inicio del apartado, otro de los aspectos en los que resultan útiles las técnicas estadísticas es en la evaluación de los parámetros de calidad de los métodos optimizados.

Los parámetros de calidad de un método analítico comprenden, entre otros, la precisión, el intervalo dinámico (linealidad), los límites de detección y cuantificación (LOD y

LOQ) y la exactitud del mismo<sup>9</sup>.

La precisión se puede definir como “la concordancia que existe entre los resultados obtenidos al aplicar el método propuesto de manera repetida a la misma muestra”<sup>10</sup>. Depende exclusivamente de los errores aleatorios y puede estimarse mediante el cálculo de la desviación estándar (SD) de las repeticiones realizadas, normalmente expresada como desviación estándar relativa en porcentaje (%RSD). Existen dos términos que se usan en relación con la precisión, la repetibilidad y la reproducibilidad<sup>11</sup>. La repetibilidad se refiere a la precisión bajo las mismas condiciones, es decir, con el mismo método, el mismo laboratorio, el mismo operador, usando los mismos equipos y en cortos intervalos de tiempo. La reproducibilidad es la precisión obtenida bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, con el mismo método, bajo las mismas condiciones experimentales, pero en diferentes laboratorios, distinto operador o en días diferentes. Para una evaluación correcta de estos parámetros es necesario disponer de una muestra homogénea y calcularlos para diferentes niveles de concentración.

La elección de un modelo de calibración, preferiblemente un modelo lineal, es indispensable para poder determinar la relación entre la concentración o cantidad de analito y la respuesta analítica medida<sup>1</sup>. Es importante definir el rango de concentraciones a estudiar, el número de niveles (entre 5 y 8) y el número de réplicas para cada nivel (entre 2 y 3). Mediante la aplicación del método de mínimos cuadrados, el cual minimiza la suma de cuadrados de los residuales (diferencia entre el valor experimental y el obtenido al aplicar el modelo matemático), se estiman los parámetros del modelo lineal<sup>7,8</sup>. Para comprobar la bondad con que se ajustan los datos experimentales al modelo propuesto, se suele calcular el coeficiente de correlación (R) ó el cuadrado del mismo ( $R^2$ ). Éste es un parámetro informativo de la calidad del ajuste, sin embargo, no es un test estadístico. En este sentido, el análisis de varianza (ANOVA) puede ser una herramienta muy útil a la hora de evaluar el modelo<sup>12</sup>. Mediante el ANOVA, se examina estadísticamente el modelo, aplicando el test de linealidad, que busca si la regresión es adecuada a los datos experimentales, y el test de fallo de ajuste, que indica si el modelo lineal es correcto o no.

Dentro del rango de trabajo, también es importante establecer cuál es la concentración mínima que es posible detectar y cuantificar. En términos generales, el LOD se puede describir como la concentración que proporciona una señal significativamente diferente a la señal del blanco<sup>9</sup>. Dado que esta definición resulta bastante general, se pueden establecer diferentes aproximaciones para su cálculo. Basándose en la SD de la respuesta del blanco, el LOD se considera como la concentración que proporciona una señal igual al blanco más tres veces la SD del blanco, y el LOQ, como la concentración que proporciona una señal igual al blanco más diez veces la SD del blanco. Basándose en la curva de calibrado, el LOD se define como aquella concentración para la que se obtiene una señal igual a tres veces la SD de la pendiente, y el LOQ, como diez veces la SD de la pendiente<sup>13</sup>. Por último, basándose en la

relación señal ruido (S/N) el LOD puede considerarse como aquella concentración que produce una señal igual a tres veces el ruido, y el LOQ, como diez veces el ruido<sup>9</sup>.

La exactitud se puede definir como “el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor verdadero”<sup>10</sup>. Cuando el término se aplica a resultados experimentales, éste incluye la combinación de la componente sistemática del error (bias) y la componente aleatoria (precisión)<sup>14</sup>; sin embargo, a menudo la exactitud se describe sólo como la componente sistemática del error, es decir, en el sentido de bias.

Existen diferentes métodos para su determinación como el uso de materiales de referencia certificados (MRC), la comparación con un método de referencia, normalmente un método oficial, el análisis de muestras con adición, o los estudios interlaboratorio<sup>7</sup>. Cada uno de ellos presentan ciertas ventajas y desventajas que deben ser evaluadas para cada caso en particular, por ejemplo el que no existan MRC en una matriz concreta o el coste y la lentitud que implica un estudio interlaboratorio.

La opción más sencilla es la evaluación de la exactitud a partir de muestras con adición<sup>8</sup>. En este caso, es frecuente el calcular el grado de recuperación (%R), es decir la diferencia de los resultados obtenidos en la muestra con adición de estándar y la muestra sin adición, considerando el valor teórico de la adición como valor de referencia.

Así mismo, el método de las adiciones estándar constituye una aproximación al estudio del problema de los efectos de interferencia de matriz, y por tanto una confirmación de la adecuación del método para el análisis de muestras reales.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) J.N. Millar, J.C. Millar, Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4ª Edición, Pearson Educación S.L., Madrid, 2002
- (2) G.E.D. Box; W.G. Hunter; J.S. Hunter. Estadística para Investigadores. Introducción al Diseño de Experimentos, Análisis de Datos y Construcción de Modelos, Editorial Reverté S. A., Madrid, 1989.
- (3) S.N. Deming, S.L. Morgan, Experimental Design: a chemometric approach, Elsevier, Ámsterdam, 1993.
- (4) Statgraphics-Plus, Diseño experimental, Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA, 2003.
- (5) R. Compañó Beltrán, A Ríos Castro, Garantía de Calidad en los Laboratorios Analíticos, Editorial Síntesis, Madrid, 2002.
- (6) F.M. Garfield, Principios de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos, AOAC Internacional, 1996.
- (7) P. de Bièvre, H. Günzler, Validation in Chemical Measurements, Springer, New York, 2005.
- (8) The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EURACHEM, Teddington, UK, 1998.
- (9) International Conference Harmonization (ICH), Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology, ICH Q2 A, 1994.
- (10) International Standard ISO 5725-1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- General principles and definitions, International Organization for Standardization, Ginebra, 1994.
- (11) International Standard ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Basic methods for the determination of the repeatability and reproducibility of a standard measurement method, International Organization for Standardization, Ginebra, 1994.
- (12) D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.G. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, en: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Parte A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- (13) International Standard ISO 11843-2, Capability of detection- Methodology in linear calibration case, International Organization for Standardization, Ginebra, 1997.

(14) International Standard ISO 5725-4, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method, International Organization for Standardization, Ginebra, 1994.





### ***III. PARTE EXPERIMENTAL GENERAL***



En este capítulo, se describen los reactivos de uso general, los materiales y los procedimientos generales empleados en la realización de los estudios incluidos en la presente memoria. Para conocer los patrones comerciales, muestras, equipos instrumentales, condiciones de medida y procedimientos experimentales específicos de cada uno de los estudios realizados consultar los apartados correspondientes del **Capítulo IV. Resultados e interpretación.**

### III.1. DISOLVENTES, REACTIVOS Y GASES

- Agua ultrapura (Milli-Q), obtenida en el propio laboratorio con un sistema de purificación (Millipore).
- Acetona (Vorquímica), de baja calidad utilizada para la limpieza de material.
- Acetona, 99.5% (Merck).
- n-Hexano, 96% (Scharlau).
- Ciclohexano, 99.5% (Merck).
- Isooctano, 99.5% (Merck).
- Metanol, grado gradiente HPLC (Merck).
- Anhídrido acético, 99% (Aldrich).
- Bicarbonato de potasio, 99.7% (Aldrich).
- Carbonato de potasio, 99 % (Merck).
- Cloruro de sodio, 99% (Aldrich).
- Nitrógeno seco usado como gas portador y gas auxiliar del GC-ECD y del GC-FID, generado y purificado convenientemente en el mismo laboratorio.
- Helio, 99,999% (Hidrocarburos Metálicos), usado como gas portador del GC-MS.

### III.2. INSTRUMENTAL

#### III.2.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Material de vidrio de uso habitual en el laboratorio.
- Agitador magnético con placa calefactora Agimatic-N (P-SELECTA).
- Termómetro con escala de temperaturas de 0 a 150°C.
- Pipetas automáticas de 20-200, 100-1000 µL y 1-5 mL (TRANSFERPETTE®).
- Balanza electrónica con cinco decimales de precisión (Sartorius BP211D).
- Balanza granataria (Sartorius BP310S).

#### III.2.2. SPME

- Viales de vidrio PYREX de 22 y 120 mL (SUPELCO).
- Septa recubiertos de teflón para el sellado de los viales (SUPELCO).
- Cápsulas de aluminio para el sellado de los viales (SUPELCO).

- Agitador magnético con placa calefactora Agimatic-N (P-SELECTA)
- Termómetro con escala de temperaturas de 0°C a 150 °C.
- Barras magnéticas recubiertas de PTFE de 25 mm de longitud y 6 mm de diámetro (Afora) y puntas de acero empleadas como barras agitadoras.
- Soporte de SPME para inyección manual (SUPELCO).
- Kit de fibras SPME para muestreo manual (SUPELCO). En la siguiente tabla se muestran las características de cada una de ellas.

Antes de ser utilizadas por primera vez, las fibras de SPME deben ser acondicionadas convenientemente en una atmósfera inerte. Con este acondicionamiento previo de la fibra se consiguen eliminar los posibles residuos procedentes de su fabricación, evitan la aparición de picos extraños durante el análisis.

Las distintas fibras empleadas en los estudios aquí recogidos en esta memoria, se acondicionaron en el sistema inyector de un cromatógrafo de gases en las condiciones recomendadas por la casa comercial y que figuran en la **Tabla III.2.2.1**.

**Tabla III.2.2.1.** Características, condiciones de trabajo y acondicionamiento, de las fibras utilizadas en los estudios de aplicación de SPME.

Material Adsorbente	Espesor de Fase (µm)	Tª de trabajo (°C)	Tª de acondic. (°C)	Tiempo (h)	Polaridad	Tipo
PDMS	100	270	250	1	Apolar	No enlazada
PDMS-DVB	65	270	260	0.5	Bipolar	Parcialmente entrecruzada
CAR-PDMS	75	300	280	0.5	Bipolar	Parcialmente entrecruzada
CW-DVB	65	260	250	0.5	Polar	Parcialmente entrecruzada
PA	85	300	300	2	Polar	Parcialmente entrecruzada

### III.2.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA

- Filtros de fibra de vidrio, 47 mm de diámetro, 0,45 µm de tamaño de poro (Whatman).
- Equipo de filtración.

### III.3. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE PATRONES Y MUESTRAS ACUOSAS

Durante la realización de los estudios que se detallan en el Capítulo IV se prepararon disoluciones patrón y disoluciones de trabajo, tanto en disolventes orgánicos, como en matrices acuosas, siguiendo un procedimiento similar.

En todos los casos se partió de patrones comerciales de los compuestos (sólidos o disoluciones de concentración conocida), a partir de los cuales se prepararon por pesada, distintos patrones conteniendo uno o varios de los analitos de interés. El disolvente empleado en estos patrones debe disolver con cierta facilidad a los analitos, o ser miscible con los disolventes en los que los analitos estaban originalmente disueltos.

Se prepararon a continuación patrones intermedios en acetona para la preparación de las muestras acuosas.

Todas las disoluciones se conservaron a -20°C en ausencia de luz hasta un periodo máximo de un mes.

Las muestras de agua empleadas en las distintas pruebas se tomaron en botellas de color ámbar de distinto tamaño (1 o 2.5 L), con tapón de rosca con la cara recubierta de Teflon. Se conservaron a 4°C en ausencia de luz, por un periodo máximo de una semana. Las muestras de agua residual se filtraron, antes de su análisis, con filtros de fibra de vidrio de 0.45 µm de tamaño de poro

Las muestras con adición se prepararon añadiendo distintos volúmenes de patrones acetónicos hasta alcanzar un determinado nivel de concentración en el volumen de muestra analizado. Para obtener una distribución homogénea de los analitos en la matriz y así poder emplear alícuotas de una misma muestra para las diferentes investigaciones se precisa un tiempo de equilibrio. Por tanto, las muestras se conservaron a 4 °C en nevera durante un periodo de 12 a 24 h antes de ser analizadas.

La presencia de acetona en la matriz conduce a un descenso de la cantidad de los analitos extraída con el recubrimiento de SPME, por lo que el volumen de acetona siempre se mantuvo por debajo del 0.5% del volumen total de la muestra analizar. La cantidad de acetona añadida a las muestras en los estudios de la linealidad y de la exactitud de los métodos propuestos, se mantuvo constante en todos los experimentos, independientemente de la adición realizada.

#### **IV. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN**





## IV.1. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS SINTÉTICAS EN MUESTRAS ACUOSAS

### IV.1.1. FRAGANCIAS NITROGENADAS

Dado que las fragancias nitrogenadas evidencian un carácter más tóxico<sup>1,2</sup> que las fragancias policíclicas y están sometidas a mayores restricciones, se decidió comenzar el estudio de determinación de fragancias sintéticas en muestras acuosas por este grupo de compuestos.

La mayoría de los métodos publicados hasta el momento para el análisis de fragancias sintéticas, están centrados en el estudio de las fragancias policíclicas, aunque algunos incluyen algún compuesto nitrogenado. Tal como se indicaba en el **Apartado II.1.2** del Capítulo de Introducción, son pocos los trabajos desarrollados hasta el momento sobre la aplicación de la SPME para el análisis de estos compuestos en agua, pero ponen de manifiesto el potencial de esta técnica para este fin<sup>3,4</sup>. Sin embargo, en estos trabajos, por una parte, no se ha incluido la familia completa de fragancias nitrogenadas, y por otra, no se han optimizado los factores que afectan al proceso de microextracción o se han investigado utilizando metodología univariante.

Considerando estas premisas, se decidió desarrollar un método de SPME y cromatografía de gases con detector de micro captura electrónica (GC- $\mu$ ECD) para la determinación de esta familia de fragancias. En concreto, se seleccionaron cuatro de los cinco compuestos pertenecientes al grupo de las fragancias nitrogenadas que todavía pueden encontrarse en productos comerciales. Los factores que afectan a la SPME se optimizaron mediante diseño experimental, permitiendo seleccionar las mejores condiciones de trabajo minimizando el número de experiencias y considerar las interacciones entre factores que no son detectables mediante el ensayo individual.

Los resultados obtenidos en la optimización se discuten en los siguientes apartados, así como el estudio de los parámetros analíticos de calidad del método propuesto.

**IV.1. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS SINTÉTICAS EN MUESTRAS ACUOSAS..... 123****IV.1.1. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS NITROGENADAS..... 123****IV.1.1.1. PARTE EXPERIMENTAL..... 125**IV.1.1.1.1. *Patrones y muestras..... 125*IV.1.1.1.2. *Problemas de contaminación de las muestras..... 125*IV.1.1.1.3 *Procedimiento de microextracción en fase sólida..... 126*IV.1.1.1.4. *Condiciones instrumentales de medida..... 127***IV.1.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 129**IV.1.1.2.1. *Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas  
..... 129*IV.1.1.2.2 *Optimización del proceso de microextracción mediante diseño experimental..... 132*IV.1.1.2.3 *Parámetros analíticos de calidad del método propuesto..... 140*IV.1.1.2.3.1 *Condiciones experimentales..... 140*IV.1.1.2.3.2 *Linealidad, Sensibilidad y precisión..... 140*IV.1.1.2.3.3 *Aplicación al análisis de muestras reales..... 142*

#### IV.1.1.1. PARTE EXPERIMENTAL

##### IV.1.1.1.1. Patrones y muestras

Para realizar este estudio, se partió de disoluciones individuales de 10 µg/mL en ciclohexano de los compuestos 1-tert-butil-3,5-dimetil-2,4,6-dinitrobenzoceno (MX), 3,5-dimetil-2,6-dinitro-1-tert-butil-acetilbenzoceno (MK), 4,6-dinitro-1,1,3,3,5-pentametil lindano (MM) y 1-tert-butil-2,6-dinitro-2,4,5-trimetilbenzoceno (MT), suministradas por Promochem (LGC Desealers, Barcelona, España).

Con estos patrones, se prepararon distintas disoluciones de trabajo, tanto individuales como mezclas de las cuatro fragancias nitrogenadas, en ciclohexano y acetona a diferentes concentraciones, según la finalidad del estudio a realizar.

En este estudio, se emplearon tanto muestras de agua con adición de los compuestos, como sin adición, preparadas según se indica en el **Apartado III.3**.

En la optimización del proceso de microextracción y en el estudio de los parámetros analíticos de calidad del método, se utilizaron disoluciones preparadas con agua Milli-Q.

La aplicabilidad del método a muestras reales se demostró empleando muestras de agua de grifo, tomadas directamente de la traída en nuestro laboratorio, muestras discretas y compuestas (proporcionales a un flujo de 12 h), tomadas en el efluente e influente de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas situada en las cercanías de Santiago de Compostela (correspondiente a 125000 habitantes), y aguas residuales del sistema de alcantarillado, tomadas en distintos puntos de la ciudad. Justo antes de su análisis, se filtraron con filtros de fibra de vidrio de 0.45 µm de tamaño de poro, siguiendo las recomendaciones marcadas en el **Apartado II.1.2.1.2**.

##### IV.1.1.1.2. Problemas de contaminación de las muestras

Las fragancias son compuestos muy persistentes y presentes en la mayoría de los productos de limpieza, por lo que, existe un riesgo potencial de contaminación. En el caso de las fragancias nitrogenadas, el riesgo de contaminación de las muestras es menos probable que el caso de otros compuestos, como Galaxolide y Tonalide; no obstante, no debe

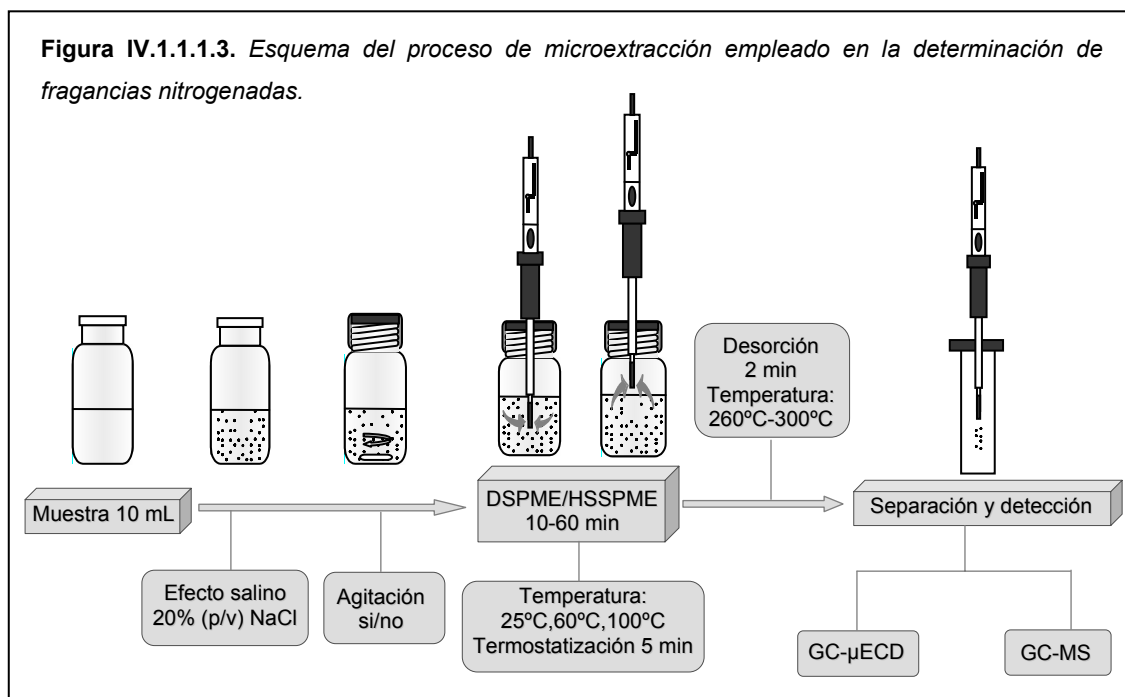
subestimarse, y por tanto, hay que tomar las precauciones necesarias para minimizar las posibles fuentes de interferencias en el laboratorio de análisis.

Para evitar la contaminación durante el manejo de las muestras, se utilizaron guantes de nitrilo sin polvo y material de vidrio lavado siguiendo un protocolo determinado (ver **Apartado IV.1.2.1.2**). Además, el analista no utilizó perfumes ni productos conteniendo fragancias durante los análisis.

#### IV.1.1.1.3 Procedimiento de microextracción en fase sólida

En este estudio, se utilizaron las siguientes fibras comerciales: poliacrilato de 85  $\mu\text{m}$  (PA), polidimetilsiloxano de 100  $\mu\text{m}$  (PDMS), Carboxen-polidimetilsiloxano de 75  $\mu\text{m}$  (CAR-PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenceno de 65  $\mu\text{m}$  (PDMS-DVB) y Carbowax-divinilbenceno de 65  $\mu\text{m}$  (CW-DVB). Antes del primer uso, todas las fibras se acondicionaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver **Tabla III.2.2.1**).

La **Figura IV.1.1.1.3** muestra el esquema general del procedimiento de microextracción empleado en la determinación las fragancias nitrogenadas en matrices acuosas.



Para la realización de los análisis, se depositaron alícuotas de 10 mL de muestra en viales de espacio de cabeza de 22 mL. A continuación, los viales se sellaron empleando cápsulas de aluminio y septa recubiertos internamente de PTFE.

En las pruebas en las que se aplicó agitación magnética, antes de encapsular el vial, se introdujeron barras magnéticas recubiertas de PTFE de 8 mm de longitud y 3 mm de diámetro, a modo de agitadores, y en los experimentos en los que se estudió el efecto salino, se añadió un 20% peso/volumen de cloruro sódico a la muestra.

El proceso de extracción se realizó manteniendo el vial en un baño de agua a temperatura controlada. El vial con la muestra se introdujo en el mismo 5 min antes de la extracción, para alcanzar la temperatura de trabajo. Posteriormente, se perforó el septum con una aguja, y se introdujo a su través la guía metálica del dispositivo de SPME, con la fibra retraída para su protección. Una vez sujeto el soporte con una pinza, se expuso la fibra en cuestión al espacio de cabeza (HSSPME) o directamente a la muestra (DSPME) durante 25 min (entre 10-60 min en el estudio cinético).

Una vez finalizado el periodo de extracción, la fibra se retrajo, para retirar el dispositivo del vial, y se insertó inmediatamente en el inyector del cromatógrafo de gases, para llevar a cabo el análisis cromatográfico. La desorción se realizó durante 2 min, a 260°C para la fibra de CW-DVB, 270°C para PDMS y PDMS-DVB, y 300°C para PA y CAR-PDMS. Finalmente, la fibra se introdujo en otro cromatógrafo a la misma temperatura durante 5 min para evitar efectos de memoria en análisis posteriores.

#### IV.1.1.1.4. Condiciones instrumentales de medida

En la determinación se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo HP-6890, provisto de un detector  $^{63}\text{Ni}$  de micro captura electrónica ( $\mu\text{ECD}$ ). Para la confirmación en la identificación de los compuestos, se utilizó un cromatógrafo de gases modelo Varian® 3800 (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA), provisto de un inyector split/splitless, trabajando en el modo splitless y acoplado a un detector de masas de trampa de iones modelo Varian® Saturn 2000, operando en ionización electrónica (EI). El control del equipo y el procesamiento de la señal se llevó a cabo con el programa informático Varian® Saturn GC-MS, versión 5.4<sup>5</sup>.

Las condiciones de operación del GC- $\mu\text{ECD}$ , en las que se realizó la determinación se recogen en la **Tabla IV.1.1.1.4.1**.

**Tabla IV.1.1.1.4.1. Condiciones de operación del GC- $\mu$ ECD utilizadas en la determinación de nitrofragancias en muestras acuosas.**

HP-6890 (GC)	
Columna	HP-5 (25mx0.25mmx0.25 $\mu$ m)
Gas portador	N <sub>2</sub>
Gas de llama	Aire/H <sub>2</sub>
Tipo de inyector	Split/splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	2 min
Tª del inyector	de 260°C a 300°C según el tipo de fibra
Presión en cabeza de columna	12 psi
Flujo de purga de septum	mL/min
Flujo de split	mL/min
Flujo en columna	1 mL/min (constante)
Flujo de gas auxiliar	40 mL/min.
Tª del detector ( $\mu$ ECD)	285 °C
Programa de Temperaturas	
• Primer Gradiente	
Tª inicial	60°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de temperatura	10°C/min
Tª final	250°C
Tiempo final	21 min
• Segundo Gradiente	
Tª inicial	250°C
Rampa de temperatura	20°C/min
Tª final	280°C
Tiempo final	1.5 min
Tiempo total del análisis	23.5 min

Las condiciones instrumentales del GC-MS se resumen en la tabla siguiente.

**Tabla IV.1.1.1.4.2. Condiciones instrumentales del GC-MS utilizadas en la determinación de nitrofragancias en muestras acuosas.**

Varian® 3800 (GC)	
Columna	CPSil8 CB low-bleed MS (25mx0.25mmx0.25 $\mu$ m)
Gas portador	He
Tipo de inyector	Split/splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	2 min
Tª del inyector	de 260°C a 300°C según el tipo de fibra
Flujo de split	50 mL/min
Flujo en columna (He)	1.2 mL/min a 40°C
Tª de la línea de transferencia	290°C
Programa de Temperaturas	
• Primer Gradiente	
Tª inicial	60°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de temperatura	10°C/min
Tª final	250°C
Tiempo final	21 min
• Segundo Gradiente	
Tª inicial	250°C
Rampa de temperatura	20°C/min
Tª final	280°C
Tiempo final	1.5 min
Tiempo total del análisis	23.5 min
Varian® Saturn 2000 (MSD)	
Modo de ionización	El (ionización electrónica), 70 eV
Voltaje del multiplicador	1800 V
Voltaje de modulación axial	4 V
Tª de la trampa de iones	220°C
Tª del manifold	50°C
Rango de masas	100-300 m/z
Velocidad de escaneado	0.6 s/scan
Corriente de emisión del filamento	15 $\mu$ A

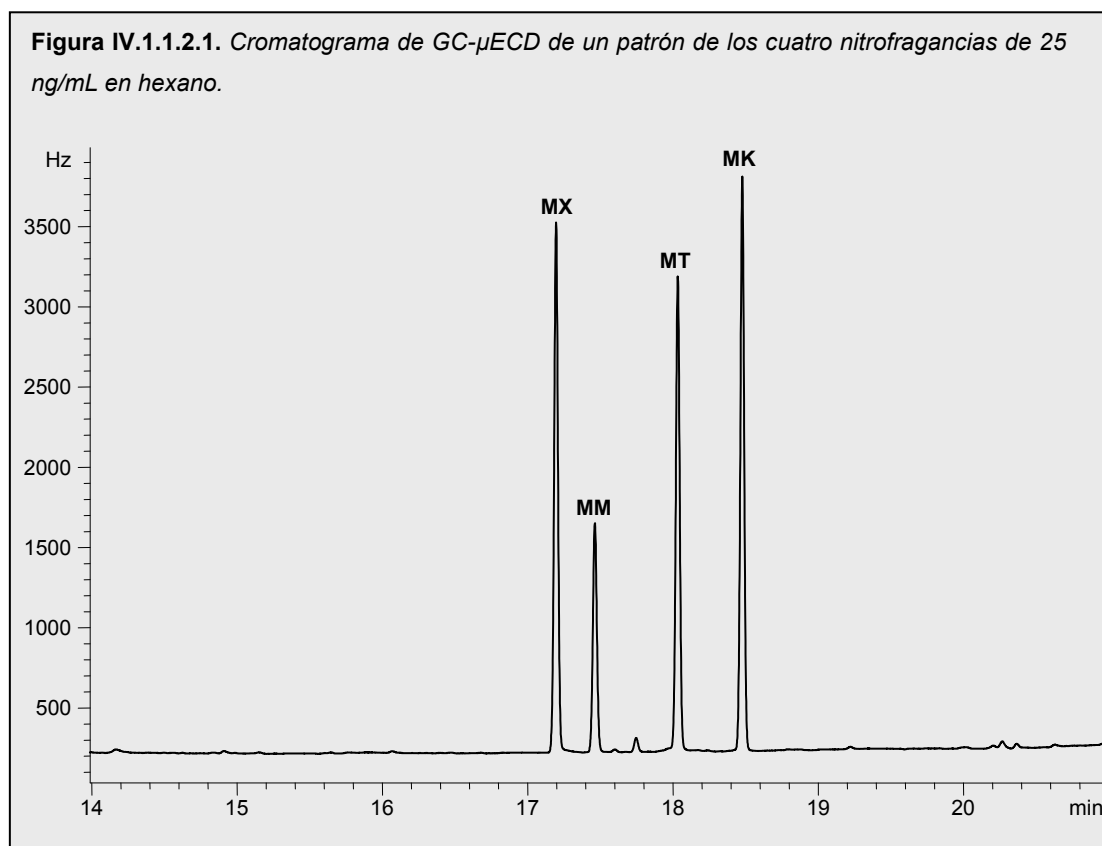
#### IV.1.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### IV.1.1.2.1. Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas

La identificación de las cuatro fragancias estudiadas se realizó en función del tiempo de retención ( $t_r$ ) mediante la inyección en GC- $\mu$ ECD de 2  $\mu$ L de patrones individuales de 100 ng/mL en ciclohexano de cada compuesto.

El siguiente paso fue realizar una serie de pruebas con un patrón mezcla de los cuatro compuestos, para alcanzar la mejor separación entre especies en el menor tiempo posible, hasta llegar al programa de temperaturas recogido en la **Tabla IV.1.1.1.4.1**.

La **Figura IV.1.1.2.1** muestra el cromatograma de GC- $\mu$ ECD obtenido en la inyección de un estándar de 25 ng/mL de las cuatro fragancias. Como se puede observar, se obtiene una resolución adecuada de los cuatro compuestos en las condiciones cromatográficas optimizadas.



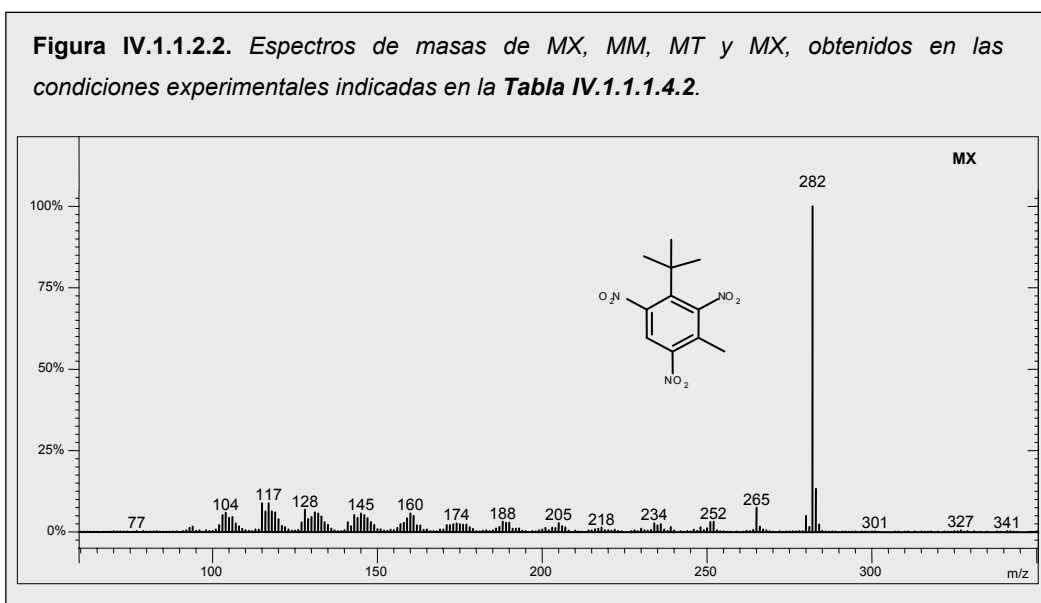
Para comprobar la viabilidad de la microextracción, se realizaron una serie de pruebas consistentes en la extracción, bajo diferentes condiciones, de disoluciones acuosas conteniendo los compuestos a un nivel de concentración de pg/mL. Los resultados obtenidos confirmaron la aplicabilidad de la SPME para el análisis de estos compuestos.

Las mismas pruebas se realizaron en GC-MS, además de la inyección de patrones, para asegurar la correcta identificación de los compuestos, basándose en los espectros de masa y en los  $t_r$  para las mismas condiciones cromatográficas (**Tabla IV.1.1.1.4.2**).

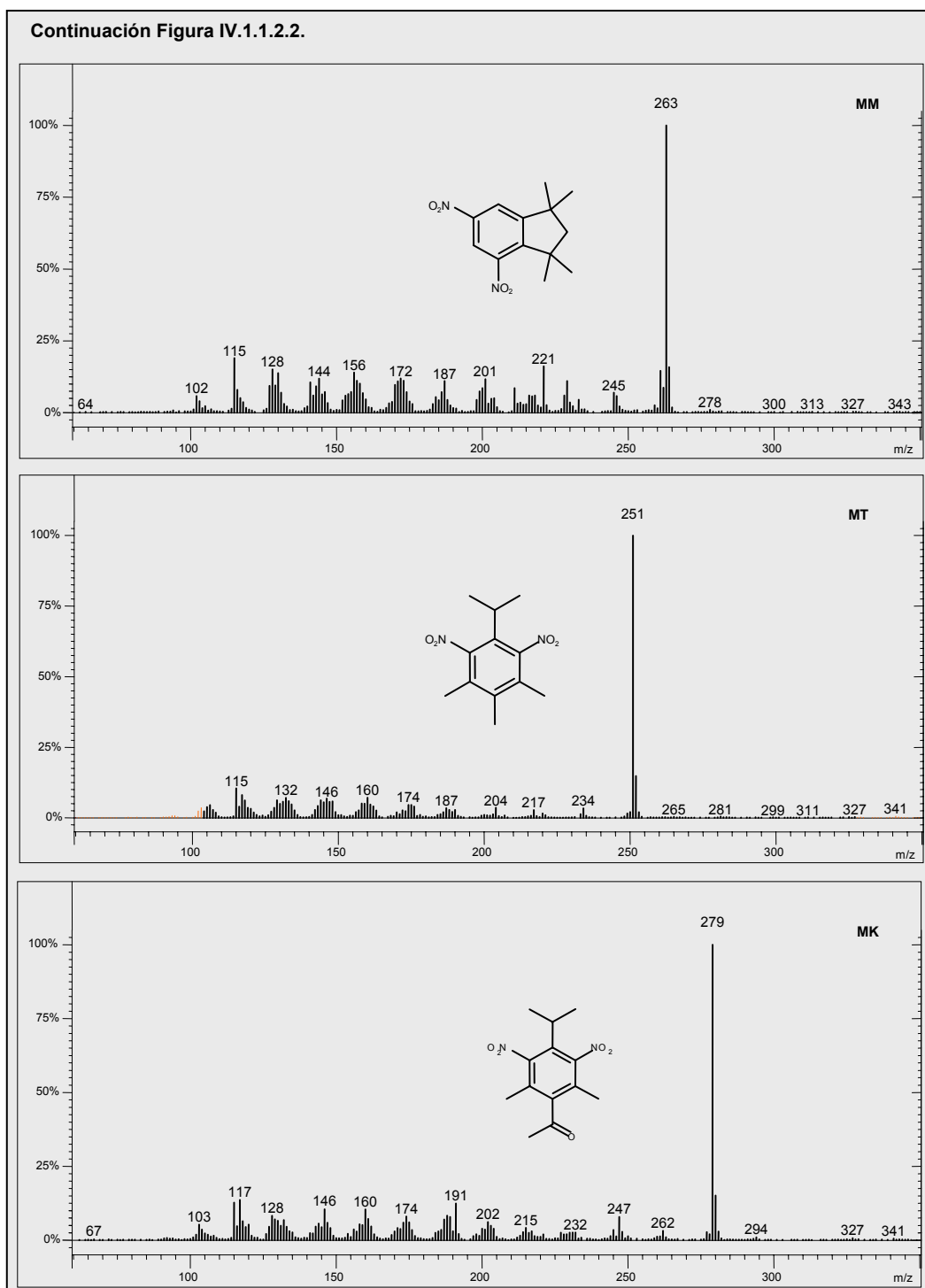
**Tabla IV.1.1.2.1.** *Tiempos de retención, ión de cuantificación e iones de identificación para las cuatro fragancias nitrogenadas.*

Compuesto	$t_r$ (min)	Iones de identificación	Ión de cuantificación
MX	17.19	282,283 ( $[M-CH_3]^+$ ), 297 ( $M^+$ )	282
MM	17.46	263,264 ( $[M-CH_3]^+$ ), 278 ( $M^+$ )	263
MT	18.03	251,252 ( $[M-CH_3]^+$ ), 266 ( $M^+$ )	251
MK	18.48	279,280 ( $[M-CH_3]^+$ ), 294 ( $M^+$ )	279

Los espectros de masas obtenidos en las condiciones experimentales indicadas (ver **Figura IV.1.1.2.2**), presentaron como ión más abundante el correspondiente a la pérdida de un metilo ( $[M-CH_3]^+$ ), que se seleccionó como ión de cuantificación, mientras que el ión molecular ( $M^+$ ) se empleó para la identificación (ver **Tabla IV.1.1.2.1**).







#### IV.1.1.2.2. Optimización del proceso de microextracción mediante diseño experimental

La optimización de la técnica de SPME, se realizó mediante un diseño factorial, permitiendo conocer cuales son los parámetros que más influyen en el proceso y obtener sus valores óptimos, con un número reducido de experiencias (ver **Apartado II.6.1**). En el diseño seleccionado, se estudió la influencia del tipo de fibra, de la temperatura de extracción, del modo de muestro, de la agitación de la muestra y de la adición de sal.

En general, el recubrimiento polimérico de la fibra es un factor muy importante en el proceso de extracción (ver **Apartado II.4.2**), tanto por su composición como por sus dimensiones. Actualmente, existen un número importante de fibras disponibles comercialmente (ver **Tabla III.2.2.1**), sin embargo, incluir un estudio completo de las mismas en el diseño, implicaría un gran número de experiencias. Por tanto, previamente al diseño, se evaluaron cinco tipos de recubrimiento de fibra, con el fin de seleccionar dos de ellas.

Para ello, se llevaron a cabo extracciones de estándares acuosos a un nivel de concentración de 200 pg/mL, por duplicado, con cada una de las siguientes fibras: PDMS (100  $\mu$ m), PDMS-DVB (65  $\mu$ m), PA (85  $\mu$ m), CAR-PDMS (75  $\mu$ m) y CW-DVB (65  $\mu$ m). Las muestras se extrajeron en el modo de espacio de cabeza a 100°C durante 25 minutos.

Con los resultados obtenidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, mediante el programa Statgraphics® Plus, para determinar la significación estadística de las diferencias entre las fibras<sup>6</sup>.

**Tabla IV.1.1.2.2.1.** Valores de *F* y *p* para el análisis de varianza (ANOVA) y test de rango múltiple aplicados al estudio del recubrimiento de fibra.

Compuesto	ANOVA		Test de Rango Múltiple: Grupos homogéneos				
	F	p	PA	CW-DVB	PDMS	CAR-PDMS	PDMS-DVB
MX	17.86	0.008			X X	X X	X
MM	7.54	0.038	X	X	X	X X	X
MT	8.61	0.031	X	X	X	X	X
MK	7.80	0.036	X	X	X X	X	X

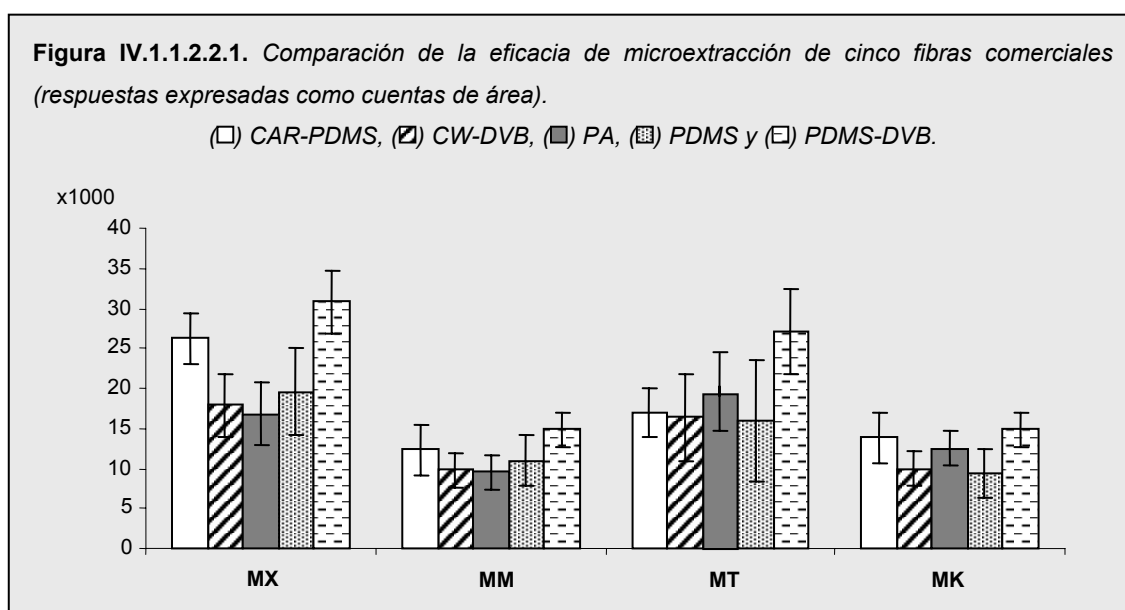
El ANOVA descompone la varianza en dos componentes, una asociada a la varianza entre fibras y otra asociada a la varianza entre las réplicas realizadas con cada una de las

fibras, es decir, al error experimental. El valor de F es la relación entre estas dos componentes de la varianza. Cuando el valor de p para el test F es menor de 0.05, se considera que la varianza entre grupos es mayor que la de dentro de cada grupo, y por tanto, que existe una diferencia significativa entre las fibras estudiadas. Como podemos comprobar en la **Tabla IV.1.1.2.2.1**, existen diferencias significativas entre las fibras para todas las nitrofragancias.

Por otra parte, el test de rango múltiple nos indica qué fibras proporcionan resultados estadísticamente diferentes a las otras. En este caso el método usado para discriminar las medias es el de la mínima diferencia significativa de Fisher, a un nivel de significación del 95%.

En la **Tabla IV.1.1.2.2.1**, los grupos homogéneos, es decir sin diferencias significativas entre ellos, se indican con un X en la misma fila. En general, aparecen dos grupos homogéneos. Uno formado por las fibras PDMS-DVB y CAR-PDMS, y otro formado por el resto de las fibras en el que también se puede incluir la fibra de CAR-PDMS.

La **Figura IV.1.1.2.2.1** muestra la comparación entre la media de las respuestas obtenidas para cada fragancia usando las cinco fibras. El intervalo mostrado corresponde a un nivel de confianza del 95%. Tal como se puede observar, la eficacia de extracción para PDMS-DVB, o para ambas, PDMS-DVB y CAR-PDMS, es mayor que para las otras fibras, por lo que se seleccionaron estas dos fibras para el diseño experimental. *Winkler et al.*<sup>4</sup>, también encontraron la fibra de PDMS-DVB, como la más adecuada para la determinación de MK en muestras de agua de río, aunque en su estudio no incluyeron la fibra de CAR-PDMS y no aplicaron una comparación estadística.



Teniendo en cuenta estos resultados, los niveles de los factores experimentales considerados en el diseño fueron:

- Tipo de fibra (PDMS-DVB y CAR-PDMS).
- Temperatura de la extracción (25, 60 y 100 °C).
- Modo de muestreo (directo, DSPME, y en espacio de cabeza, HSSPME).
- Efecto salino (0 y 20% p/v de cloruro sódico).
- Agitación (sí, no).

Se seleccionó un diseño factorial fraccionado (*Mixed level fraction Design*)  $3 \times 2^4 - 2$  de resolución IV para minimizar el número de experimentos, ya que incluye tan sólo 12 experiencias, mientras que el diseño factorial completo consistiría en 32 experiencias. En este diseño, los efectos principales se distinguen de las interacciones de dos factores, pero estas interacciones se confunden entre sí. Aun así, permite establecer los efectos de segundo orden, pero los resultados deben interpretarse con precaución.

En todas las experiencias se emplearon alícuotas de muestra de 10 mL a un nivel de concentración de 500 pg/mL, muestreadas en viales de 22 mL durante 25 minutos. Las condiciones de extracción en cada caso vienen determinadas por la matriz de experiencias (**Tabla IV.1.1.2.2.2**), obtenida mediante el programa Statgraphics® Plus<sup>6</sup>.

**Tabla IV.1.1.2.2.2.** Matriz de experiencias del diseño factorial fraccionado  $3 \times 2^4 - 2$ .

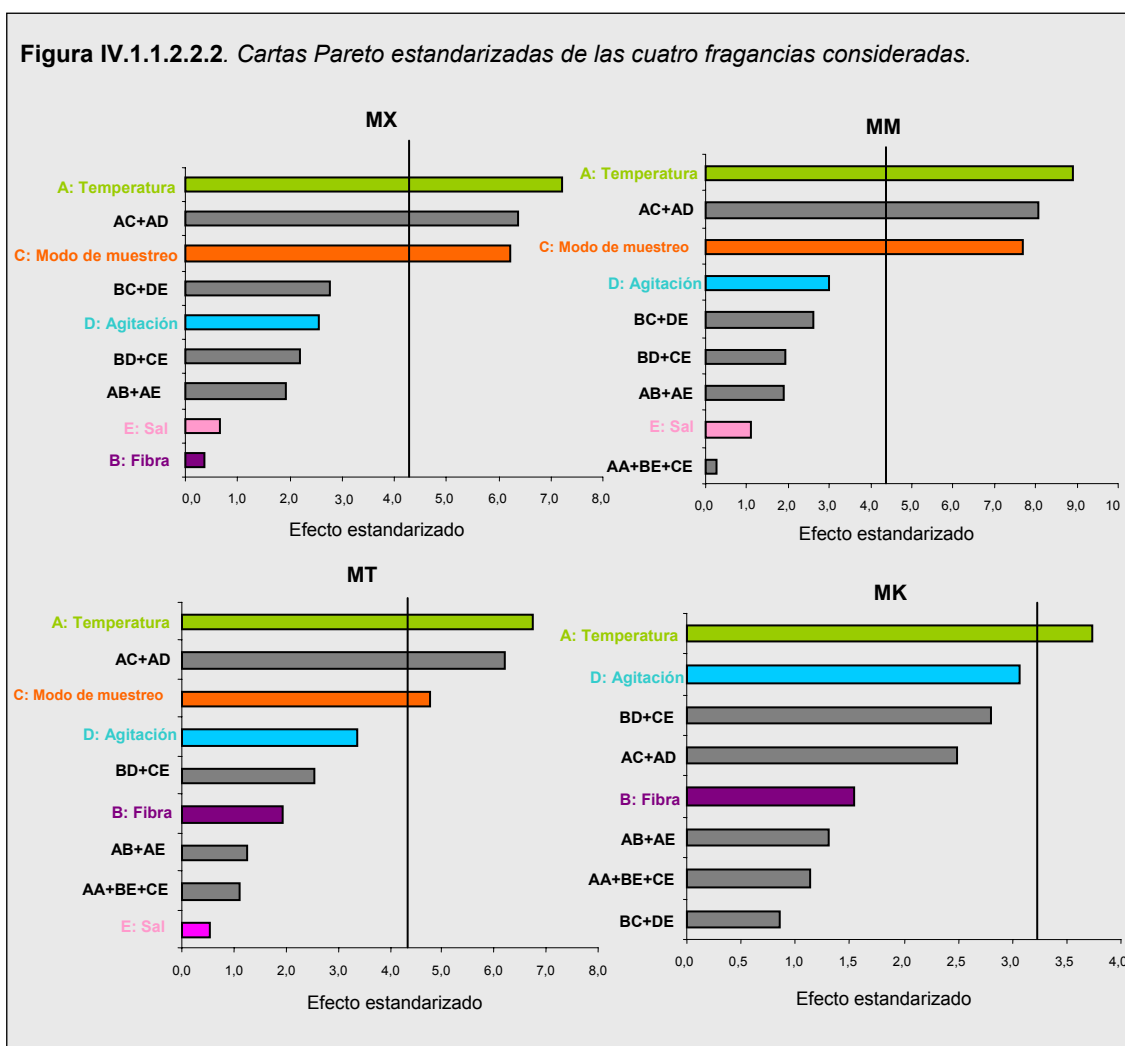
Experiencia	Temperatura (°C)	Fibra	Modo de muestreo	Agitación	Adición de sal (%)
1	25	CAR-PDMS	HSSPME	sí	0
2	60	PDMS-DVB	HSSPME	no	0
3	100	CAR-PDMS	HSSPME	sí	0
4	100	PDMS-DVB	DSPME	no	20
5	25	CAR-PDMS	DSPME	no	0
6	60	PDMS-DVB	DSPME	sí	0
7	100	CAR-PDMS	DSPME	no	0
8	100	PDMS-DVB	HSSPME	sí	20
9	60	CAR-PDMS	HSSPME	no	20
10	25	PDMS-DVB	HSSPME	sí	20
11	25	PDMS-DVB	DSPME	no	20
12	60	CAR-PDMS	DSPME	sí	20

Una vez realizadas las doce experiencias, se llevó a cabo el análisis de los resultados obtenidos (ver **Tabla IV.1.1.2.2.3**).

**Tabla IV.1.2.2.3.** Respuestas analíticas (cuentas de área) obtenidas para cada compuesto en las 12 experiencias de que consta el diseño.

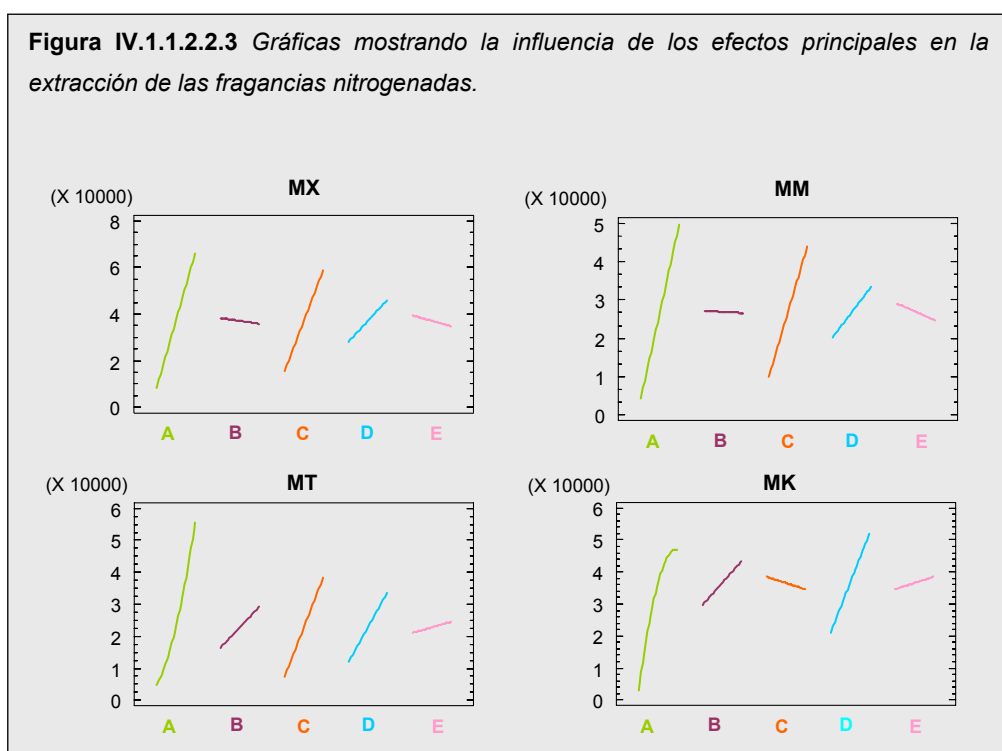
Experiencia	MX	MM	MT	MK
1	4782	9105	3973	241
2	34375	85143	48257	2660
3	140703	319848	158754	19523
4	5920	10774	10731	7858
5	2325	3729	1650	1746
6	43276	82902	61515	38649
7	13262	23552	12040	11047
8	102883	245133	262301	55579
9	66585	134028	60994	16529
10	20511	35761	27435	1443
11	3411	5931	5202	2469
12	6792	11364	11703	15221

De este análisis, se obtuvieron las Cartas Pareto de efectos estandarizados que se muestran en la **Figura IV.1.1.2.2.2.**



Con estas gráficas, podemos apreciar en qué medida afecta cada uno de los factores o interacciones entre factores a la eficacia del procedimiento de SPME. Para simplificar la interpretación, se han eliminado los factores e interacciones que exhibían los menores efectos sobre la respuesta de cada fragancia. La longitud de cada barra en las gráficas es proporcional al valor absoluto asociado al efecto estandarizado, que se obtiene dividiendo el efecto estimado de cada factor o suma de interacciones, por su error estándar. Los efectos están dispuestos en orden decreciente de importancia, permitiendo identificar fácilmente los más importantes. Estas representaciones incluyen además una línea vertical, que se corresponde con el límite de significación para un nivel de confianza del 95%, por lo que los factores o interacciones cuya barra supere dicha línea se considerarán significativos.

Por otra parte, se obtuvieron las gráficas de efectos principales para cada compuesto, mostradas en la **Figura IV.1.1.2.2.3**.



En este caso, la magnitud del efecto de cada factor, se basa en la longitud de las líneas, pero además permite establecer en qué sentido afecta a través del signo de la pendiente. El signo positivo de la pendiente indica un aumento de la eficacia de la extracción al pasar del nivel bajo al alto; mientras que un signo negativo significa lo contrario.

El estudio combinado de las cartas Pareto con las gráficas de efectos principales resulta imprescindible para obtener la información necesaria para saber qué factores y de qué modo influyen significativamente el proceso de microextracción.

Como puede verse en las **Figuras IV.1.1.2.2.2.** y **IV.1.1.2.2.3.**, la temperatura (A) fue el factor más importante para todos los compuestos. Este factor fue el único estudiado a tres niveles, mostrando el valor óptimo a 100°C, que corresponde con el nivel más alto estudiado. Por el contrario, el factor fibra (B) no fue significativo para ningún compuesto (**Figura IV.1.1.2.2.2.**). Tal como se muestra en la **Figura IV.1.1.2.2.3.**, para MX y MM con ambas fibras se obtuvieron resultados comparables, mientras que para MT y MK, la pendiente y la longitud de las líneas indican que la fibra de CAR-PDMS presentó mejor eficacia de extracción.

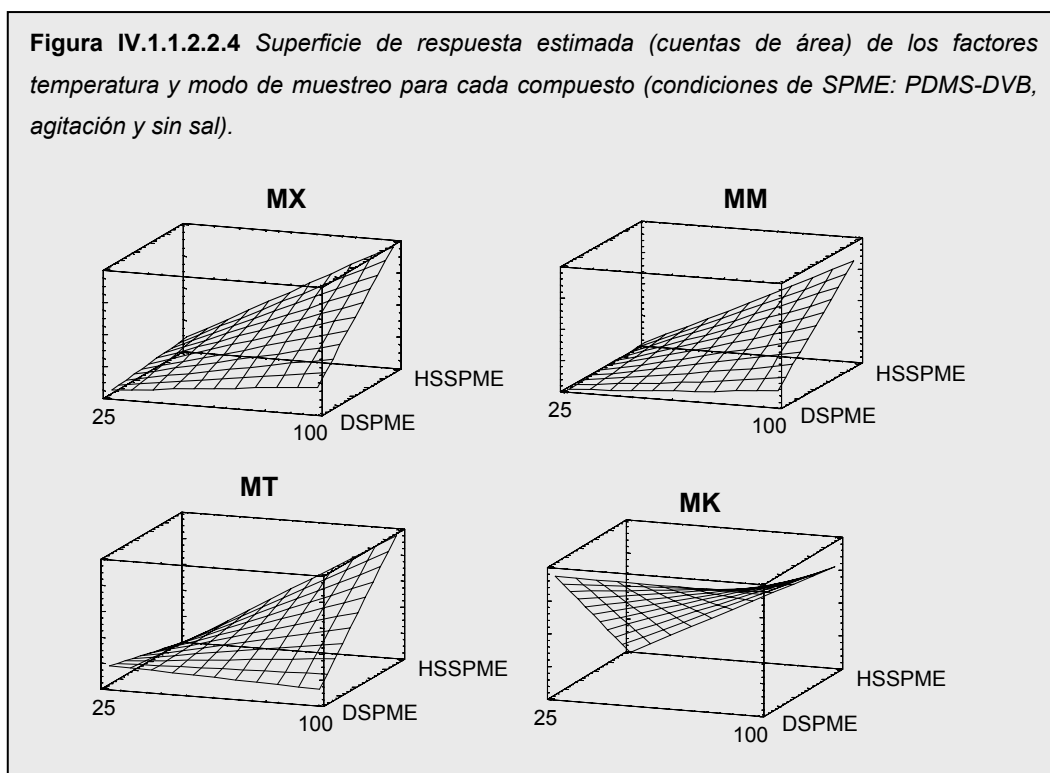
El modo de muestreo (C) también fue significativo para la mayoría de los compuestos, excepto para MK, y los mejores resultados se obtuvieron al nivel más alto de este nivel, es decir, muestreando el espacio de cabeza (HSSPME) (ver **Figura IV.1.1.2.2.3.**).

Por otra parte, la agitación (D) presentó una influencia próxima a la significación en la extracción de la mayoría de las fragancias, especialmente para MK, aunque en ningún caso alcanzó el nivel de significación (**Figura IV.1.1.2.2.2.**). La aceleración de la transferencia de masa mediante la agitación conduce a una disminución en el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, pero no afecta a la respuesta si ya se ha alcanzado (ver **Apartado II.4.2.**). La pendiente positiva de las líneas asignadas a este factor en la **Figura IV.1.1.2.2.3.** indica que la agitación de las muestras favorece la extracción, por tanto, la extracción de los compuestos debe encontrarse bajo condiciones cinéticas.

El efecto salino (E) tampoco fue significativo para ninguno de los compuestos (ver **Figura IV.1.1.2.2.2.**). Observando la pendiente de las líneas correspondientes a este factor en la **Figura IV.1.1.2.2.3.**, podemos concluir que la adición de sal produce un efecto casi inapreciable en la extracción de los compuestos. Según los principios expuestos en el **Apartado II.4.3.**, la adición de sal debería incrementar la eficacia de extracción, ya que incrementa la fuerza iónica de la disolución, haciendo los compuestos orgánicos menos solubles, y por tanto, mejorando el paso del analito desde la solución acuosa al espacio de cabeza y a la fibra.

Respecto a las interacciones entre factores, la **Figura IV.1.1.2.2.2** indica que sólo la interacción entre la temperatura y el modo de muestreo (AC), la cual aparece confundida con la interacción entre la temperatura y la agitación (AD), alcanzó el nivel de significación. De las dos, ésta primera es la que resulta más interesante, teniendo en cuenta que se trata de la interacción entre los dos factores que mostraron un efecto significativo en la microextracción de los compuestos.

En la **Figura IV.1.1.2.2.4** se muestra la superficie de respuesta estimada para los factores temperatura y modo de muestreo para cada fragancia.



Tal como se ve en la Figura, existe una interacción entre ambos factores, en mayor o menor medida, para todos los compuestos. Para MX y MM la respuesta para DSPME es inferior a la obtenida por HSSPME a cualquier temperatura, aunque se observa un importante incremento en la eficacia de HSSPME a 100°C. De hecho, estas son las condiciones óptimas. Para MT, sólo a 25°C la respuesta obtenida mediante DSPME es ligeramente superior a la obtenida por HSSPME. Sin embargo, para MK la respuesta por DSPME fue bastante alta, tanto a 25°C como a 100°C, pero debido al incremento que se produce en la respuesta por HSSPME al aumentar la temperatura, la eficacia de extracción de ambos modos fue comparable a 100°C.

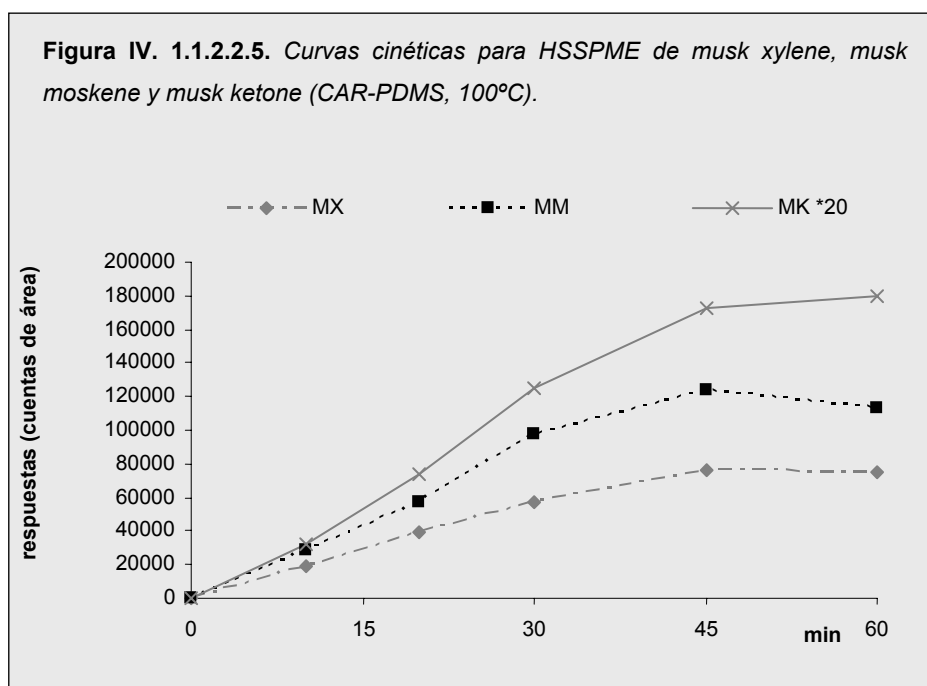
Aunque el modo de muestro HSSPME no suele recomendarse para la extracción de compuestos poco volátiles como MT y MK (ver constante de Henry **Tabla II.1.1.1.1**), al aumentar la  $T^a$  de extracción su eficacia mejora de forma notable.

Teniendo en cuenta los aspecto termodinámicos de la SPME (ver **Apartado II.4.3.2**), si nos encontrásemos bajo condiciones de equilibrio, al aumentar la temperatura la cantidad de analito extraída debería disminuir, ya que se trata de un proceso exotérmico. Dado que no se aprecia un descenso de la señal al aumentar la temperatura para ninguno de los dos modos de muestreo, podemos suponer que nos encontramos en condiciones cinéticas.



Por tanto, el incremento de temperatura lo que provoca es una aceleración de la cinética de extracción para HSSPME, determinada, en este caso, por la transferencia de masa del analito entre la fase líquida y la fase gas, lo que explicaría el incremento en la respuesta para 100°C.

Para completar el estudio de optimización del método, se decidió evaluar el efecto del tiempo de extracción en la respuesta mediante el análisis de muestras de agua con adición de los compuestos tras 10, 20, 45 y 60 minutos en el modo HSSPME empleando la fibra de CAR-PDMS. La **Figura IV.1.1.2.2.5** muestra las cinéticas de extracción de MX, MM y MK.



A partir de las curvas cinéticas, se confirma que con el tiempo de extracción utilizado durante el diseño (25 min), el proceso se encuentra bajo condiciones cinéticas, siendo necesarios aproximadamente 45 min para alcanzar el equilibrio.

Tras el análisis de toda la información, se seleccionó como método de trabajo, el muestreo del espacio de cabeza a 100°C. La agitación de la muestra se incluyó, aunque no fue un factor significativo. En cuanto al tipo de recubrimiento, se seleccionó CAR-PDMS para el método, aunque ambas fibras, PDMS-DVB y CAR-PDMS, podrían ser adecuadas. Se descartó la adición de sal, porque no fue significativa para ningún compuesto, y se mantuvo un tiempo de 25 min, considerando que la sensibilidad es suficientemente alta para proponer un método rápido de acuerdo con el tiempo de análisis cromatográfico.

#### IV.1.1.2.3 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO PROPUESTO

##### IV.1.1.2.3.1 Condiciones experimentales

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de SPME dadas por el diseño, se decidió evaluar las características analíticas del método propuesto que se resume en la **Tabla IV.1.1.2.3.1**.

**Tabla IV.1.1.2.3.1** *Condiciones experimentales del método de SPME propuesto para la determinación de nitrofragancias en muestras de agua.*

Parámetro	Valor
Volumen del vial	22 mL
Volumen de muestra	10 mL
Modo de muestreo	HSSPME
Temperatura	100°C
Fibra	CAR-PDMS
Agitación	si
Adición de sal	0%
Tiempo de extracción	25 min

##### IV.1.1.2.3.2 Linealidad, sensibilidad y precisión

Para evaluar la linealidad del método, se analizaron muestras de agua Milli-Q con adición de los compuestos a cinco niveles, comprendidos en un rango de concentraciones entre 5-1000 pg/mL para MM, MT y MK, y entre 1-1000 para MX. Se seleccionó este rango debido a que las concentraciones encontradas en muestras de agua reales en la bibliografía (ver **Tabla II.1.1.3.1.1**), en concreto en aguas residuales, se encuentran entre estos niveles de concentración.

**Tabla IV.1.1.2.3.2.1** *Estudio de la linealidad.*

Compuesto	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )
MX	0.9991
MM	0.9994
MT	0.9973
MK	0.9984

Los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) para el análisis de regresión de la respuesta correspondiente (ver **Tabla 1.1.2.3.2.1**) fueron iguales o superiores a 0.997 demostrando que existe una relación proporcional directa entre la cantidad extraída por la fibra y la concentración en la muestra.

Los límites de detección (LODs) del método se consideraron como las concentraciones de analito correspondientes a tres veces la señal analítica del fondo para el nivel más bajo de los incluidos en el estudio de la linealidad. El ruido de fondo se calculó integrando diferentes zonas de los cromatogramas cercanas a los picos cromatográficos de los analitos.

En la **Tabla IV.1.1.2.3.2.2** se recogen los LODs estimados empleando la GC- $\mu$ ECD como técnicas de separación y cuantificación. Se incluyen también los límites de cuantificación calculados para una relación señal/ruido igual a 10.

**Tabla IV.1.1.2.3.2.2** Límites de detección del método.

Compuesto	LODs (S/N=3, pg/mL) SPME	LODs (S/N=3, pg/mL) inyección líquida	LOQs (S/N=10, pg/mL) SPME
MX	0.25	73.3	0.83
MM	1.82	164	6.07
MT	3.60	83.8	12.0
MK	1.05	70.8	3.50

Los LODs encontrados, comprendidos entre 0.25 pg/mL para MX y 3.60 pg/mL para MK, fueron hasta 100 veces inferiores a los encontrados con la inyección de estándares líquidos (ver segunda columna **Tabla IV.1.1.2.3.2.2**), subrayando la alta sensibilidad del método de SPME propuesto.

La precisión del procedimiento experimental se evaluó a dos niveles de concentración, calculando la desviación estándar relativa (RSD) de tres réplicas para cada nivel.

**Tabla IV.1.1.2.3.2.3** Precisión del método.

Compuesto	Repetibilidad (RSD %, n=3)	
	50 pg/mL	500 pg/mL
MX	2.4	4.0
MM	3.7	9.4
MT	3.6	6.8
MK	11	7.9

Los valores de RSD % varían entre 2.4% y 11% para el nivel bajo, y entre 4.0% y 9.4% para el nivel alto de concentración.

#### IV.1.1.2.3.3 Aplicación al análisis de muestras reales

La validación del método se llevó a cabo con agua de grifo y con el efluente y el influente de una planta de tratamiento de agua residual urbana. No se detectaron concentraciones iniciales de MM y MT en el análisis de blancos de las muestras, pero si se detectaron niveles traza de MX y MK en las muestras de efluente e influente. A la muestra de agua de grifo se le adicionaron 0.05 ng/mL de cada compuesto, a la muestra de efluente 0.2 ng/mL y a la muestra de influente, que es la más compleja, 0.5 ng/mL. Estas muestras con adición se analizaron por el método propuesto usando calibración externa. En el caso de las aguas residuales, el área de pico para MX y MK detectadas en el blanco de muestra se sustrajo del área medida en las muestras con adición. Las recuperaciones se calcularon entonces, como la relación entre la cantidad medida mediante el calibrado y la cantidad adicionada y expresada como porcentaje, cuyos valores se recogen en la **Tabla IV.1.1.2.3.5.1**.

**Tabla IV.1.1.2.3.3.1.** *Recuperaciones (%) del método propuesto para las tres muestras estudiadas.*

Compuesto	Recuperaciones $\pm$ RSD (%)		
	Agua de grifo (n=3)	Efluente (n=3)	Influente (n=3)
MX	106 $\pm$ 3	108 $\pm$ 8	96 $\pm$ 4
MM	96 $\pm$ 4	96 $\pm$ 9	92 $\pm$ 8
MT	103 $\pm$ 4	108 $\pm$ 11	102 $\pm$ 12
MK	84 $\pm$ 10	105 $\pm$ 7	96 $\pm$ 9

La cantidad de analito estimada presentó una buena correlación con la cantidad de analito añadida obteniendo recuperaciones entre 92% y 108% (excepto 84% para MK en el agua de grifo), con valores de la RSD entre un 3% y un 12%. Por tanto, no se encontró un efecto significativo de la matriz de la muestra, incluso en el caso de muestras complejas (influente), sobre la eficacia de extracción, haciendo posible la cuantificación por calibración externa.

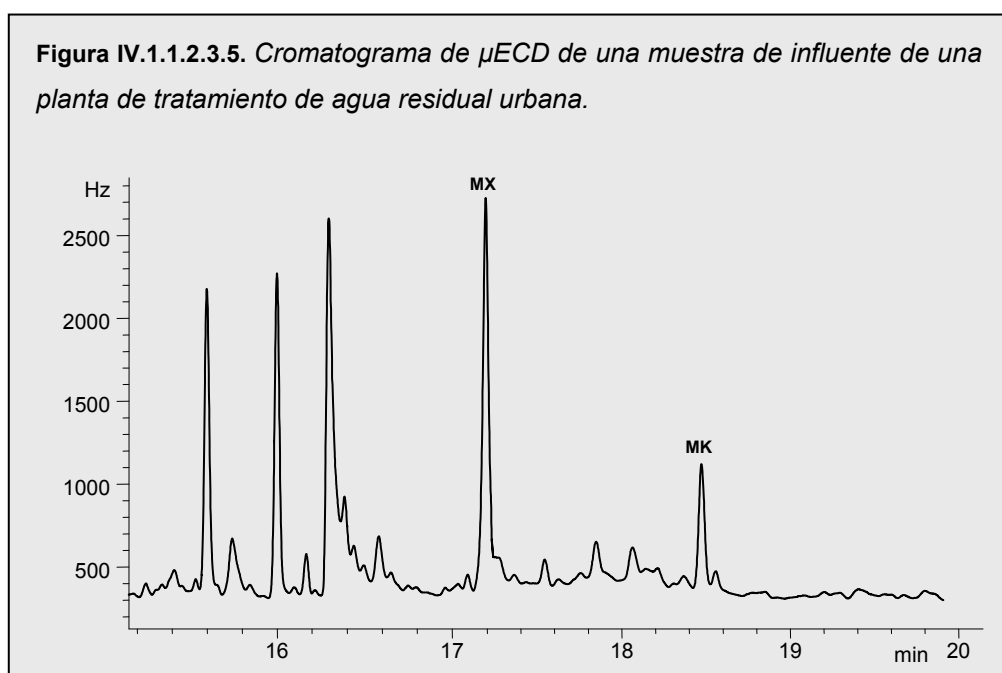
Finalmente, se estimaron las concentraciones de cinco muestras complejas de agua, incluyendo el efluente e influente de una planta de tratamiento de agua residual urbana y aguas residuales del sistema de alcantarillado tomadas de cuatro colectores diferentes de la ciudad, mediante el método propuesto.

**Tabla IV.1.1.2.3.3.2.** Concentración (pg/mL) de las fragancias nitrogenadas encontradas en las muestras reales analizadas.

Compuesto	Concentración (pg/mL)					
	Efluente (n=2)	Influente (n=3)	Agua de alcantarillado 1 (n=2)	Agua de alcantarillado 2 (n=2)	Agua de alcantarillado 3 (n=2)	Agua de alcantarillado 4 (n=2)
MX	2	7±1	9	15	6	13
MM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MT	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MK	<LOQ	3.8±0.4	5.8	<LOQ	4.3	6.3

Sólo MX y MK, las fragancias nitrogenadas más utilizadas (ver **Tabla IV.1.1.2.3.5.2**), se encontraron en las muestras, a niveles de concentraciones bajos y, en general, entorno a los mismos niveles que los encontrados en otros estudios para análisis de muestras de agua residual urbana de diferentes países europeos<sup>3,4,7</sup>. La concentración de MX fue ligeramente mayor que la de MK para todas las muestras. MX se usa principalmente en detergentes y jabones, mientras que el uso más importante de MK es en cosméticos. Los ingredientes de las fragancias usadas en productos de limpieza se eliminan después de su uso a través de los colectores domésticos, por tanto parece lógico encontrar una concentración más alta de MX que MK en este tipo de muestras. La presencia de MX y MK se confirmó mediante el análisis por (EI) GC/MS.

En la **Figura IV.1.1.2.3.5** se muestra el cromatograma de  $\mu$ ECD de la muestra de influente donde se identificaron los compuestos MX y MK.



En general, el método de HSSPME desarrollado en este estudio mostró una alta sensibilidad, con LOD del orden de los pg/mL, con buena correlación lineal en el rango de concentraciones estudiado y buena repetibilidad para las cuatro nitrofragancias; además de demostrar su viabilidad para el análisis de diferentes muestras reales, incluyendo agua residuales.

Los resultados de estudio han dado lugar a la publicación de un artículo en la revista ***Analytical Bioanalytical Chemistry***, que se adjunta en el Anexo VI.2.

#### IV.1.2. FRAGANCIAS POLICÍCLICAS

Tal como se comentaba en el capítulo de Introducción, dentro de las fragancias sintéticas, las fragancias policíclicas, en concreto HHCB (Galaxolide) y AHTN (Tonalide), son los compuestos aromáticos presentes en mayor proporción en los productos de cuidado personal. Aunque se ha demostrado que no presentan efectos toxicológicos importantes, su volumen de consumo y su baja biodegradabilidad y posible bioacumulación, los convierten en un problema importante de contaminación del medio acuático<sup>8,9</sup>.

La principal vía de entrada de estos compuestos es a través de las descargas de origen doméstico. Su entrada en el medioambiente se produce de manera continua a través de los efluentes de las EDARs, si no se consigue su eliminación completa durante su tratamiento. Las concentraciones de estos compuestos en los efluentes suelen ser del orden de los ng/mL<sup>10</sup>, aunque en las aguas superficiales se encuentran en concentraciones bajas (pg/mL)<sup>11,12</sup>. Por tanto, resulta importante el proponer métodos lo suficientemente sensibles para la monitorización de las fragancias en este tipo de muestras.

Siguiendo el estudio iniciado en el apartado anterior, se propuso un método basado en la microextracción en fase sólida acoplada a la técnica híbrida GC-MS para un análisis rápido y sencillo en muestras de agua. En este caso, se han incluido en el estudio seis fragancias policíclicas y una macrocíclica, prestando especial atención a la optimización de los parámetros que afectan a la SPME. Como en el caso de las fragancias nitrogenadas, la optimización se realizó mediante la aplicación de un diseño experimental.

A continuación se discuten los resultados obtenidos en este estudio, así como la evaluación de las características analíticas del método finalmente seleccionado.

<b>IV.1.2. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS POLÍCICLICAS.....</b>	<b>145</b>
<b>IV.1.2.1. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>147</b>
IV.1.2.1.1. Patrones y muestras.....	147
IV.1.2.1.2 Limpieza del material.....	148
IV.1.2.1.3. Procedimiento de microextracción en fase sólida.....	148
IV.1.2.1.4 Condiciones instrumentales de medida.....	150
<b>IV.1.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
<b>IV.1.2.2.1. Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas.....</b>	<b>151</b>
<b>IV.1.2.2.2. Optimización del proceso de microextracción.....</b>	<b>156</b>
IV.1.2.2.2.1. Diseño multifactorial categórico: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.....	156
IV.1.2.2.2.2. Evaluación de otros parámetros experimentales: Volumen de muestra, agitación, efecto salino y efecto memoria.....	162
<b>IV.1.2.2.3 Parámetros analíticos de calidad del método propuesto.....</b>	<b>166</b>
IV.1.2.2.3.1 Condiciones experimentales.....	166
IV.1.2.2.3.2. Linealidad.....	166
IV.1.2.2.3.3 Precisión.....	164
IV.1.2.2.3.4 Sensibilidad.....	168
IV.1.2.2.4 Aplicación a muestras reales.....	169
<b>IV.1.3. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE FRAGANCIAS NITROGENADAS Y POLICÍCLICAS.....</b>	<b>172</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>175</b>



#### IV.1.2.1. PARTE EXPERIMENTAL

##### IV.1.2.1.1. Patrones y muestras

En el desarrollo de este estudio, se utilizaron patrones sólidos comerciales de 6,7-dihidro-1,1,2,3,3-pentametil-4-(5H)-indano (Cashmeran, DPMI), 4-acetil-1,1-dimetil-6-tert.-butilindano (Celestolide, ADBI), 1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta-[g]-2-benzopirano (Galaxolide, HHCB), 7-acetil-1,1,3,4,4,6-hexametiltetralina (Tonalide, AHTN), oxacicloheptadec-10-en-2-ona (Ambrettolide), 6-acetil-1,1,2,3,3,5-hexametilindano (Phantolide, AHMI) y 5-acetil-1,1,2,6-tetrametil-3-isopropilindano (Traseolide, ATII) suministrados por Ventós (Cornella de Llobregat, Barcelona, España) y/o Promochem Iberia (Barcelona, España). Todos ellos son de grado técnico.

A partir de los compuestos sólidos, se prepararon por pesada, disoluciones patrón individuales en los disolventes indicados y con la siguiente concentración:

- DPMI (Cashmeran): 10341 µg/mL en acetona.
- ADBI (Celestolide): 10140 µg/mL en acetona.
- HHCB (Galaxolide): 11300 µg/mL en acetona.
- AHTN (Tonalide): 10784 µg/mL en acetona.
- Ambrettolide: 11320 µg/mL en acetona.
- AHDI (Phantolide): 3134 µg/mL en isooctano.
- ATII (Traseolide): 3383 µg/mL en isooctano.

Partiendo de estas disoluciones patrón se prepararon distintas disoluciones de trabajo, tanto individuales como mezclas de las siete fragancias, en diferentes concentraciones y disolventes según la finalidad del estudio a realizar.

En el proceso de optimización del método y en el estudio de los parámetros analíticos de calidad, se emplearon disoluciones de agua ultra pura Milli-Q.

En los estudios de aplicación del método, las muestras reales se obtuvieron en diferentes puntos de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas situada en las cercanías de Santiago de Compostela (correspondiente a 125 000 habitantes). Se incluyen, además, muestras de un ejercicio interlaboratorio en el que participó el laboratorio de Química Analítica del Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios, correspondientes al efluente e influente de otra EDAR (Alemania).

#### IV.1.2.1.2 Limpieza del material

Como se indicó con las fragancias nitrogenadas, existe un riesgo de contaminación de las muestras durante su manipulación. Además en el caso de las fragancias policíclicas, como HHCB y AHTN, este riesgo es todavía mayor por lo que se prestó una especial atención en establecer las precauciones necesarias para minimizar la contaminación, sobre todo en la limpieza del material utilizado.

El tratamiento del material de vidrio fue el siguiente: lavar con abundante agua de grifo, después dejar en contacto durante unos minutos con una mezcla nitrocrómica (con esto se consiguen destruir los compuestos orgánicos adsorbidos en el vidrio), tras lo cual se hizo pasar de nuevo abundante agua, y por último agua Milli-Q. El secado se realizó en una estufa a 100°C.

Se evitó en lo posible la utilización de material plástico o de teflón, para reducir posibles interferencias debidas a ftalatos y, porque además, las fragancias tienden a adsorberse en las superficies plásticas. En caso de usarlo, el proceso de lavado consistió en pasar metanol, abundante agua y finalmente agua Milli-Q, dejándolo secar al aire.

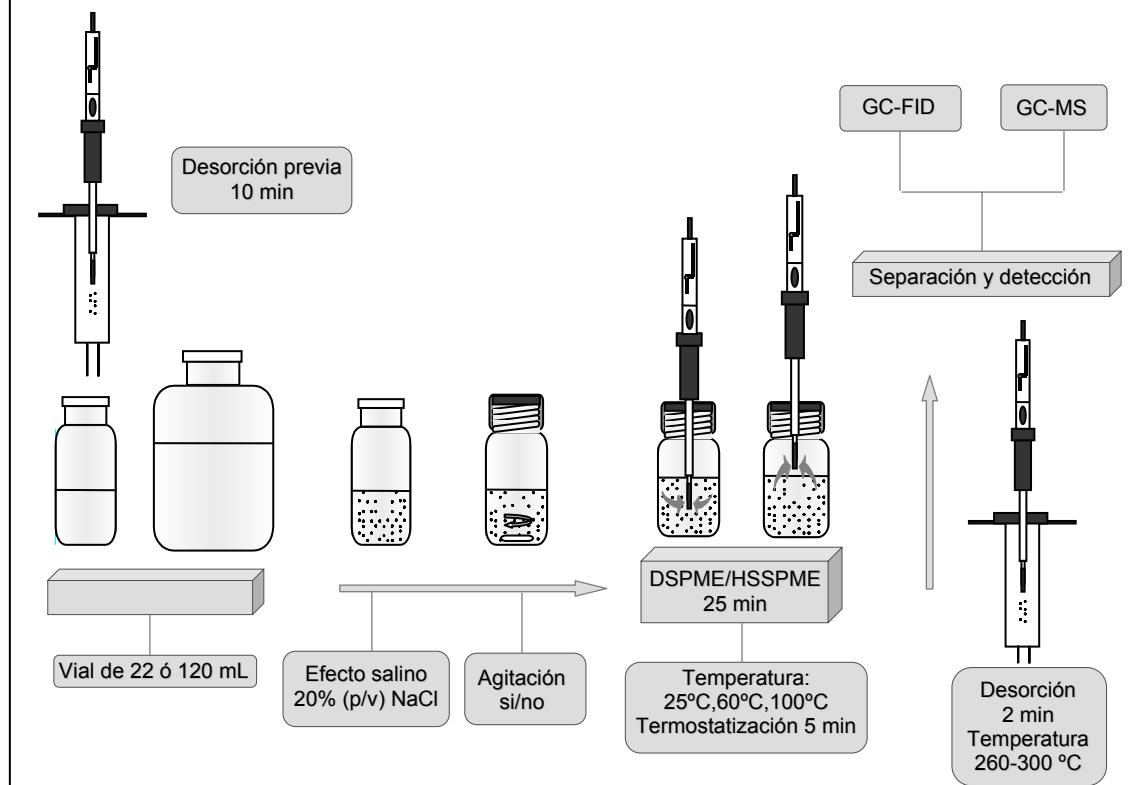
#### IV.1.2.1.3. Procedimiento de microextracción en fase sólida

Los tipos de fibras que se consideraron para la SPME y disponibles comercialmente fueron: poliacrilato de 85  $\mu\text{m}$  (PA), polidimetilsiloxano de 100  $\mu\text{m}$  (PDMS), Carboxen-polidimetilsiloxano de 75  $\mu\text{m}$  (CAR-PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenceno de 65  $\mu\text{m}$  (PDMS-DVB) y Carbowax-divinilbenceno de 65  $\mu\text{m}$  (CW-DVB), acondicionadas, antes del primer uso<sup>13</sup>.

La **Figura IV.1.2.1.3** muestra las etapas del proceso de microextracción empleado en este estudio.

Al inicio de una jornada, antes de comenzar a trabajar, las fibras se desorbieron a la temperatura habitual de trabajo durante 10 min, para asegurarse la eliminación de las fragancias, tanto de memoria presente por análisis anteriores, como por posibles absorciones debido a las concentraciones presentes en el ambiente del laboratorio.

**Figura IV.1.2.1.3.** Esquema de procedimiento de SPME empleado en la determinación de fragancias policíclicas en agua.



Las muestras se analizaron en viales de espacio de cabeza de 22 ó 120 mL, en los cuales se depositó el volumen de muestra determinado por el experimento a realizar. Los viales se sellaron con cápsulas de aluminio y septa recubiertos internamente de PTFE. En las pruebas en las que fue necesaria la aplicación de agitación magnética, antes de encapsular el vial, se introdujeron barras magnéticas a modo de agitadores.

El vial con la muestra se mantuvo en un baño de agua a temperatura controlada durante 5 min, antes de la extracción, para conseguir la temperatura indicada por el experimento (25, 60 o 100°C). A continuación se perforó el septum con una aguja, y se expuso la fibra en cuestión al espacio de cabeza o directamente a la muestra.

Una vez finalizado el periodo de extracción (25 min), la fibra se insertó inmediatamente en el inyector del cromatógrafo de gases durante 2 min., para llevar a cabo el análisis cromatográfico. Tras la desorción de la fibra, ésta se introdujo en otro cromatógrafo a la misma temperatura (temperatura recomendada por el fabricante, ver **Tabla III.2.2.1**) durante 5 min para evitar efectos de memoria en análisis posteriores.

## IV.1.2.1.4 Condiciones instrumentales de medida

Se emplearon para el análisis, un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo HP-5890, provisto de un detector de ionización de llama (FID), y un cromatógrafo de gases modelo Varian® STAR 3400 CX, provisto de un inyector split/splitless, trabajando en el modo splitless y acoplado a un detector de masas modelo Varian® SATURN 3 GC-MS, con trampa de iones operando en ionización electrónica (EI). El control del equipo y el procesado de la señal se llevo a cabo con el programa informático Varian® SATURN GC-MS, versión 5.4<sup>5</sup>.

Las condiciones de operación del GC-FID, en las que se realizaron las distintas pruebas de optimización del método de microextracción, se recogen en la siguiente tabla.

**Tabla IV.1.2.1.4.1. Condiciones de operación del GC-FID.**

HP-5890 (GC)	
Columna	BP-5
Gas portador	N <sub>2</sub>
Gas de llama	Aire/H <sub>2</sub>
Tipo de inyector	Split/splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	1 min
Tª del inyector	según el tipo de fibra
Presión en cabeza de columna	12 psi
Flujo de purga de septum	4.62 mL/min
Flujo de split	22 mL/min
Flujo en columna	1.10 mL/min.
Flujo de gas auxiliar	30 mL/min.
Tª del detector	280 °C
Programa de Temperaturas del Horno	
• Primer Gradiente	
Tª inicial	60°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de temperatura	10°C/min
Tª final	250°C
Tiempo final	21 min
• Segundo Gradiente	
Tª inicial	250°C
Rampa de temperatura	20°C/min
Tª final	280°C
Tiempo final	1.5 min
Tiempo total del análisis	27 min

Las condiciones instrumentales del GC-MS se resumen en la tabla siguiente.

Tabla IV.1.2.1.4.2 Condiciones instrumentales del GC-MS.

Varian® STAR 3400 CX (GC)	
Columna	Varian VA-5MS (25mx0.25mmx0.25µm)
Gas portador	He
Tipo de inyector	Split/splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	1 min
Tª del inyector	según el tipo de fibra
Presión en cabeza de columna	8 psi
Flujo de split	50 mL/min
Flujo en columna (He)	aprox. 1 mL/min a 40°C
Tª de la línea de transferencia	280°C
Programa de Temperaturas del Horno	
• Primer Gradiente	
Tª inicial	60°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de temperatura	10°C/min
Tª final	250°C
Tiempo final	21 min
• Segundo Gradiente	
Tª inicial	250°C
Rampa de temperatura	20°C/min
Tª final	280°C
Tiempo final	1.5 min
Tiempo total del análisis	27 min
Varian® SATURN 3 (MS)	
Modo de ionización	El (ionización electrónica), 70 eV
Voltaje del multiplicador	2100 V
Voltaje de modulación axial	4 V
Tª de la trampa de iones	200°C
Rango de masas	35-300 m/z
Velocidad de escaneado	0.6 s/scan
Corriente de emisión del filamento	23 µA
Venteo del disolvente	12 min

#### IV.1.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### IV.1.2.2.1. Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas

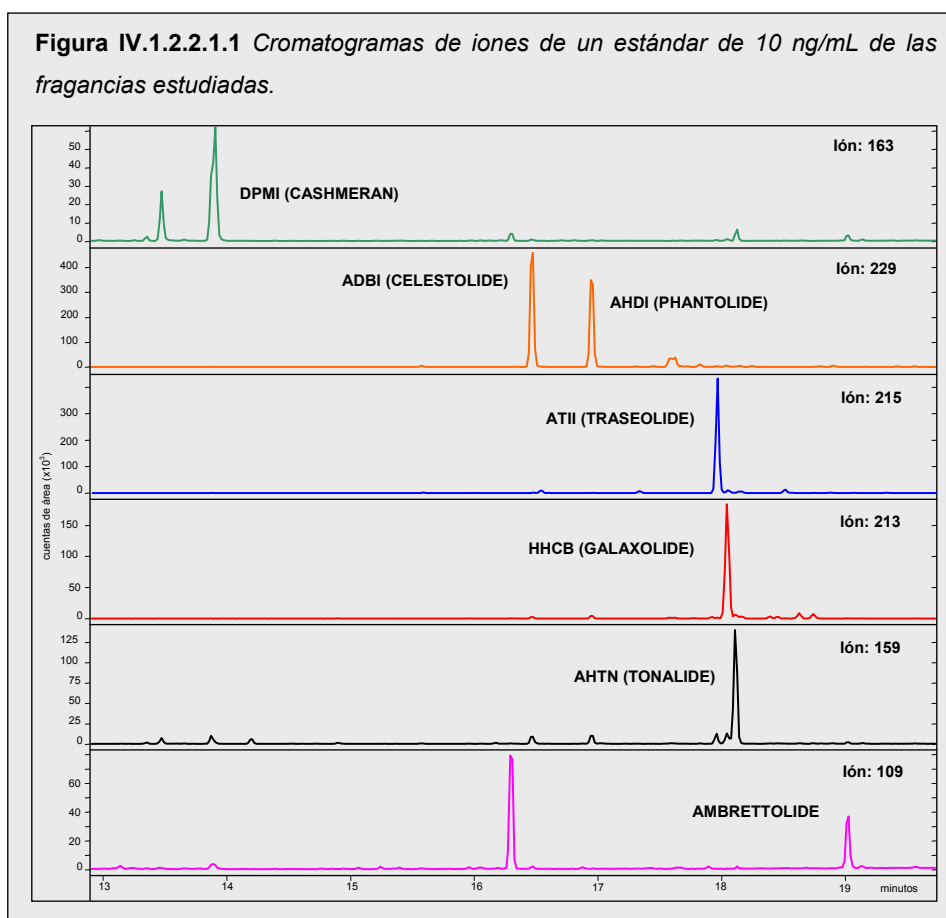
Para la identificación de las fragancias policíclicas estudiadas, se llevó a cabo el análisis mediante GC-MS de patrones individuales de los compuestos para obtener el espectro de masas correspondiente a cada compuesto, así como el tiempo de retención ( $t_r$ ).

El siguiente paso fue realizar una serie de pruebas con un patrón mezcla de los siete compuestos, para alcanzar la mejor separación entre especies en el menor tiempo posible.

Se partió del programa de temperaturas utilizado por *Winkler et al.*<sup>4</sup>, y se comprobó que la resolución de los compuestos era completa.

A continuación se realizaron una serie de modificaciones para acortar el tiempo de análisis, hasta llegar al programa de temperaturas recogido en las **Tablas IV.1.2.1.4.1 y IV.1.2.1.4.2**.

En la **Figura IV.1.2.2.1.1** se muestra los cromatogramas de iones obtenidos en la inyección de un estándar de 10 ng/mL de las siete fragancias estudiadas. Tal como se puede ver, se obtiene una resolución adecuada de los compuestos en las condiciones cromatográficas optimizadas.



En la **Tabla IV.1.2.2.1** se recogen los  $t_r$ , así como, los iones de identificación y cuantificación, para las siete fragancias.

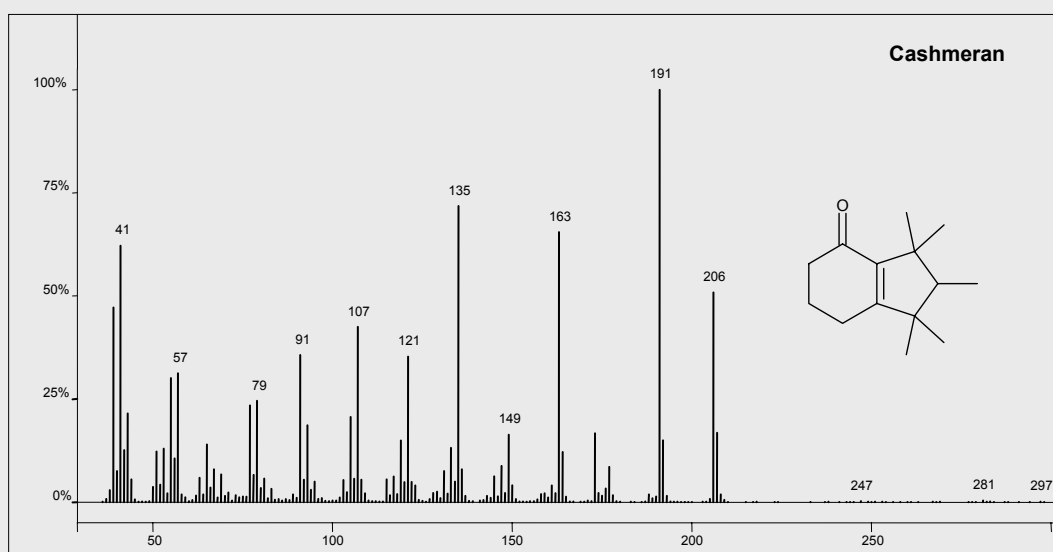
**Tabla IV.1.2.2.1** *Tiempos de retención, ión de cuantificación e iones de identificación para las siete fragancias estudiadas.*

Compuesto	t <sub>r</sub> (min)	Ión de cuantificación	Iones de identificación
DPMI	13.93	163	191, 206
ADBI	16.46	229	244, 173
AHDI	16.96	229	187, 244
ATII	17.96	215	173, 258
HHCB	18.04	213	243, 258
AHTN	18.11	159	187, 243
Ambrettolide	19.03	109	67, 81

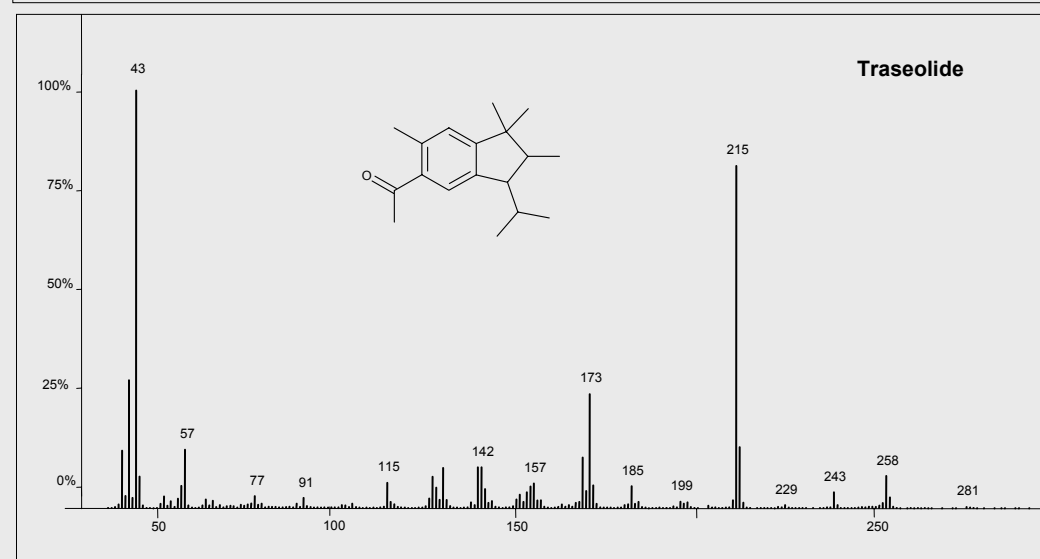
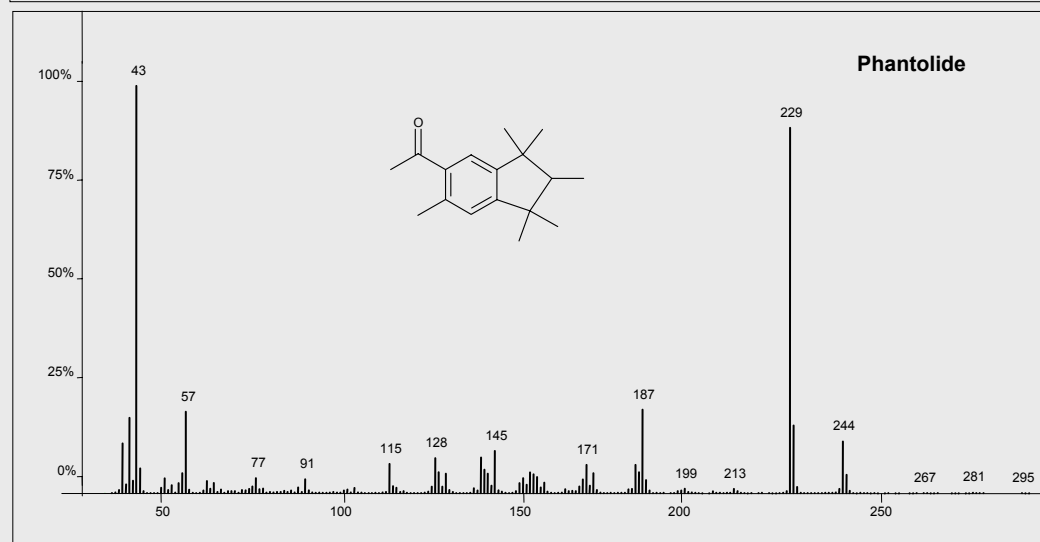
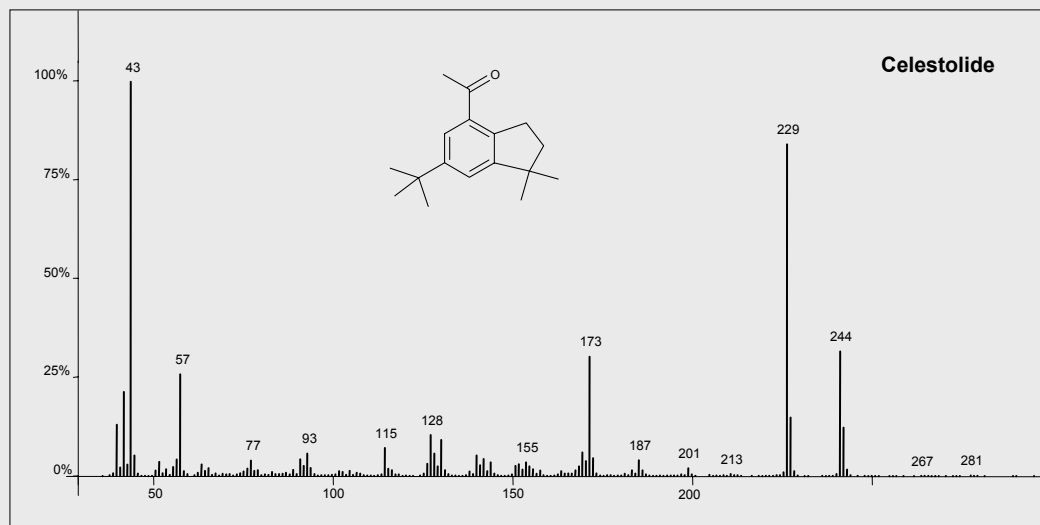
La elección de los iones característicos más adecuados para la cuantificación de cada especie, se realizó mediante la optimización de relación señal / ruido obtenida para cada ión (o suma de iones). Como iones de cuantificación no siempre se eligieron los iones base de los espectros de masas (ver **Figura IV.1.2.2.1.2**). Los criterios para su elección fueron, por una parte, la obtención de la máxima sensibilidad, y por otra, la minimización de posibles interferencias por fragmentos de otros componentes de la muestra.

Por último, se realizó la microextracción de muestras de agua Milli-Q con adición de los compuestos a concentraciones de pg/mL, confirmando la viabilidad y sensibilidad de la SPME para estos compuestos.

**Figura IV.1.2.2.1.2.** *Espectros de masas de las fragancias consideradas, obtenidos en las condiciones experimentales indicadas en la Tabla IV.1.2.1.4.2.*

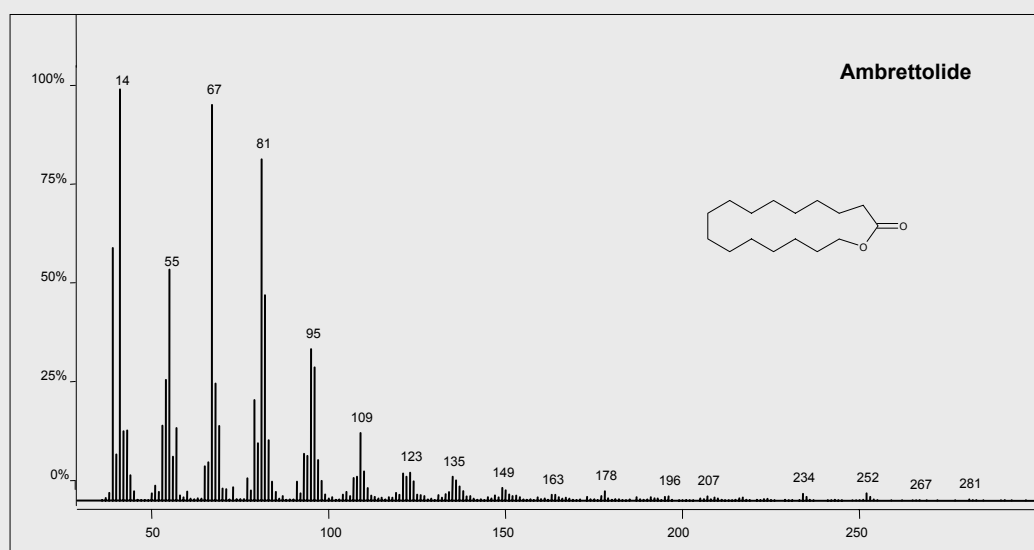
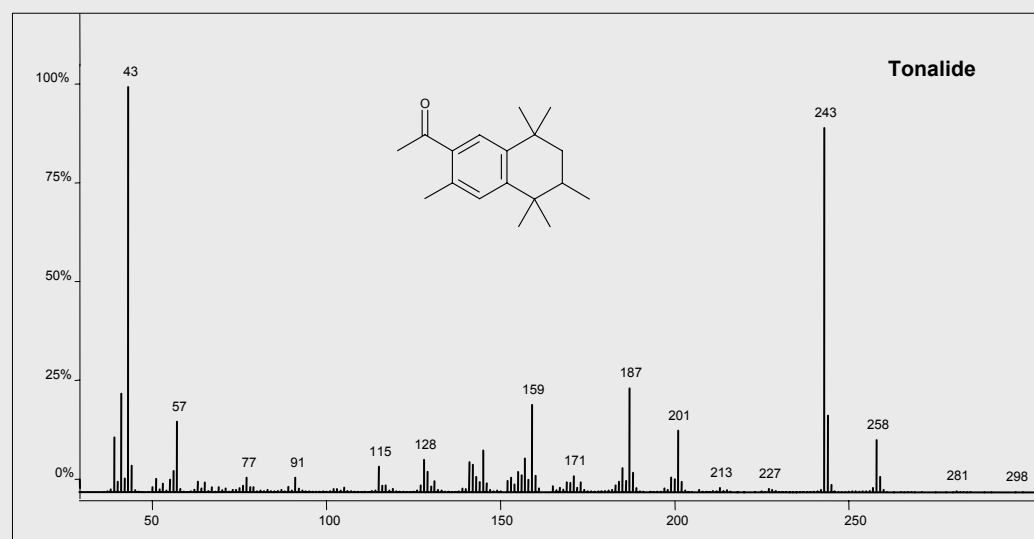
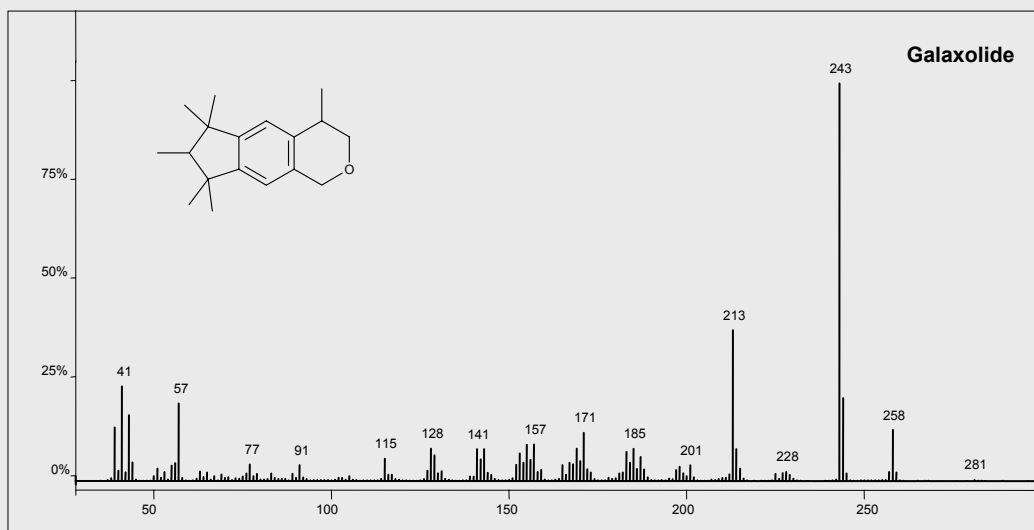


Continuación Figura. 1.2.2.1.2.





Continuación Figura. 1.2.2.1.2.



#### IV.1.2.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROEXTRACCIÓN

##### IV.1.2.2.2.1. DISEÑO MULTI-FACTORIAL CATEGÓRICO: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.

Para la optimización de la técnica de microextracción se realizó un diseño experimental, con el fin de evaluar simultáneamente los parámetros más importantes en el proceso, y obtener sus valores óptimos para la aplicación a muestras reales.

Los parámetros estudiados fueron: el tipo de fibra, la temperatura de extracción y modo de muestreo.

Al igual que en el caso de las fragancias nitrogenadas, se consideraron inicialmente las siguientes fibras comerciales, cubriendo el espectro completo de tipos de recubrimiento polimérico: PDMS (100  $\mu\text{m}$ ), PDMS-DVB (65  $\mu\text{m}$ ), PA (85  $\mu\text{m}$ ), CAR-PDMS (75  $\mu\text{m}$ ) y CW-DVB (65  $\mu\text{m}$ ).

Se analizaron con cada fibra, patrones acuosos (10 mL, 20 ng/mL) en modo de espacio de cabeza a 100°C durante 30 minutos, y de los resultados obtenidos se decidió descartar la fibra de PA, ya que la eficacia de extracción fue claramente inferior a la obtenida con las otras cuatro fibras.

Así, los factores (y niveles) que se incluyeron en el diseño fueron:

- Tipo de fibra (PDMS, PDMS-DVB, CAR-PDMS y CW-DVB).
- Temperatura de la extracción (25, 60 y 100 °C).
- Modo de muestreo (directo, SPME, y en espacio de cabeza, HSSPME).

Se seleccionó un diseño factorial completo (*Multi-factor categorical Design*)  $4 \times 3 \times 2$ . Este diseño que incluye 24 experiencias y dispone de 6 grados de libertad para estimar el error, es de resolución V, es decir, no confunde los efectos principales con las interacciones de dos factores, ni éstas entre sí, las interacciones de dos factores con las de tres factores.

En todas las experiencias, se emplearon alícuotas de muestra de 10 mL a un nivel de concentración de 20 ng/mL, muestreadas en viales de 22 mL durante 25 minutos, aplicando agitación magnética. Las condiciones de extracción se establecieron según la matriz de experiencias (**Tabla IV.1.2.2.2.1**), obtenida mediante el programa Statgraphics® Plus<sup>6</sup>.

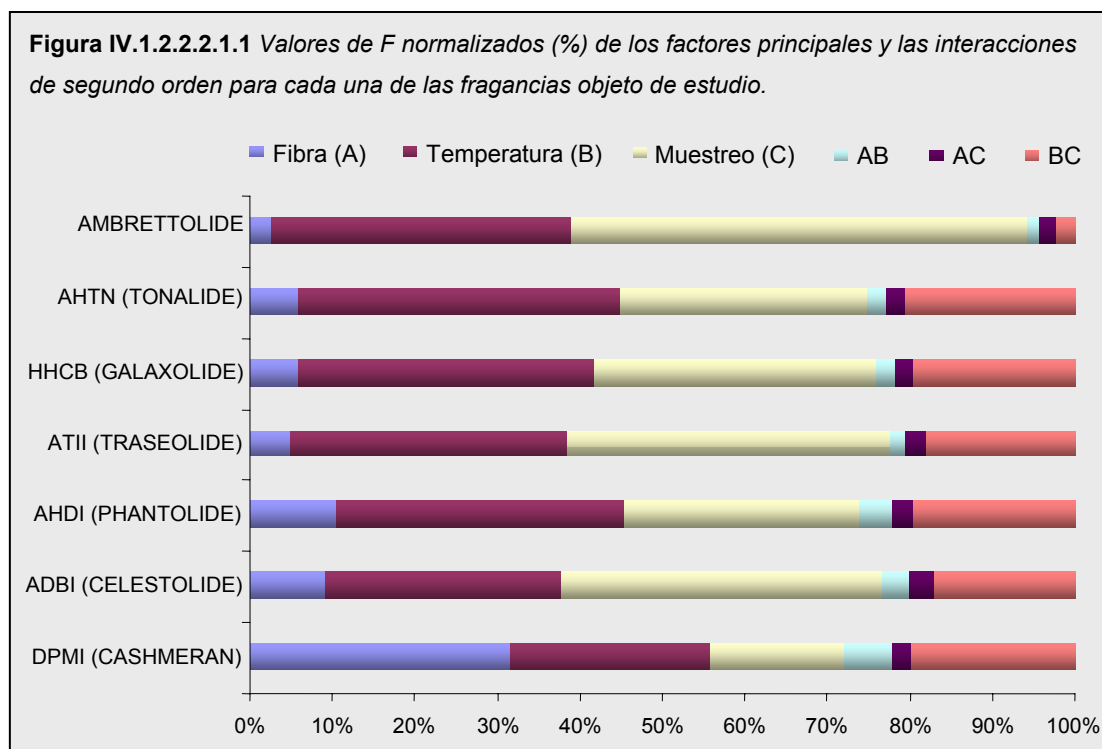
Tabla IV.1.2.2.2.1.1 Matriz de experiencias del diseño factorial completo 4\*3\*2.

Experiencia	Fibra	Temperatura (°C)	Muestreo
1	PDMS	25	SPME
2	PDMS	25	HSSPME
3	PDMS	60	SPME
4	PDMS	60	HSSPME
5	PDMS	100	SPME
6	PDMS	100	HSSPME
7	PDMS-DVB	25	SPME
8	PDMS-DVB	25	HSSPME
9	PDMS-DVB	60	SPME
10	PDMS-DVB	60	HSSPME
11	PDMS-DVB	100	SPME
12	PDMS-DVB	100	HSSPME
13	CAR-PDMS	25	SPME
14	CAR-PDMS	25	HSSPME
15	CAR-PDMS	60	SPME
16	CAR-PDMS	60	HSSPME
17	CAR-PDMS	100	SPME
18	CAR-PDMS	100	HSSPME
19	CW-DVB	25	SPME
20	CW-DVB	25	HSSPME
21	CW-DVB	60	SPME
22	CW-DVB	60	HSSPME
23	CW-DVB	100	SPME
24	CW-DVB	100	HSSPME

Tabla IV.1.2.2.2.1.2 Respuesta analítica (área de pico expresada en cuentas obtenida mediante GC-FID) de los siete compuestos estudiados.

Nº exp.	DPMI	ADBI	AHDI	ATII	HHCB	AHTN	Ambrettolide
1	42019	63110	50923	36200	64244	64689	52507
2	23339	28324	15607	14483	18423	15953	36465
3	37995	79324	68356	40563	80854	83115	51573
4	89237	229454	141052	126411	197865	168615	207956
5	16629	89685	61542	75427	113836	111865	121008
6	41718	213451	142053	189730	273865	264748	294954
7	93312	74488	62170	34814	69625	63810	32143
8	31343	28472	15776	12663	18652	15797	26964
9	105422	75850	66568	35643	71180	66115	44022
10	146719	246187	150420	138248	203518	175490	221029
11	47162	100328	87391	69486	111118	113027	96736
12	251250	519780	371709	354749	504882	506636	449240
13	71214	65815	55935	35177	62002	61218	39337
14	16811	17840	10205	7976	11252	8969	15562
15	152553	136500	118973	61106	117462	115100	54294
16	188495	406216	242559	222862	301984	277483	281083
17	63372	164051	130790	97280	138225	157688	102721
18	129753	536914	366115	356998	413768	503662	381878
19	20461	39822	33701	26382	37404	42343	34710
20	26665	25291	14607	10704	15629	12568	23794
21	27775	63276	54494	40770	62300	68661	54139
22	69104	160416	103520	98329	134173	122511	158647
23	23581	61736	53001	45250	65330	73206	62227
24	38710	141131	111150	132483	159067	184132	187429

Los datos obtenidos (**Tabla IV.1.2.2.2.1.2**) en los 24 experimentos propuestos por el diseño se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). El valor de F y los valores de p obtenidos del análisis, permiten determinar que factores son estadísticamente significativos.



En cuanto al valor de F, éste se define como la relación entre la media cuadrática del factor considerado y la media cuadrática del error total. Por tanto, el valor F cuantifica la contribución de cada factor sobre la varianza de la respuesta analítica. Cuanto más significativo sea un factor, mayor será su valor F.

La **Figura IV.1.2.2.2.1.1** muestra los valores F normalizados (expresados como %) para los efectos principales e interacciones de segundo orden.

Según los valores de F obtenidos, la temperatura de extracción y el modo de muestreo fueron los parámetros más significativos para la mayoría de los compuestos, excepto para el DPMI, para el cual, la naturaleza de la fibra fue el factor más importante.

Por otra parte, en la **Tabla IV.1.2.2.2.1.3**, se recogen los valores p.

**Tabla IV.1.2.2.1.3** Valores-*p* obtenidos en el análisis de varianza. En **negrita** aparecen los valores para los factores o interacciones estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Compuesto	Valor-p					
	Factores principales			Interacciones		
	Fibra (A)	Temperatura (B)	Muestreo (C)	AB	AC	BC
DPMI	<b>0.04</b>	0.07	0.14	0.49	0.78	0.10
ADBI	<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.29	0.29	<b>0.02</b>
AHDI	<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	0.24	0.38	<b>0.01</b>
ATII	0.08	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.30	0.23	<b>0.01</b>
HHCB	0.08	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.33	0.35	<b>0.01</b>
AHTN	0.07	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.26	0.28	<b>0.01</b>
Ambrettolide	0.12	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.30	0.19	<b>0.00</b>

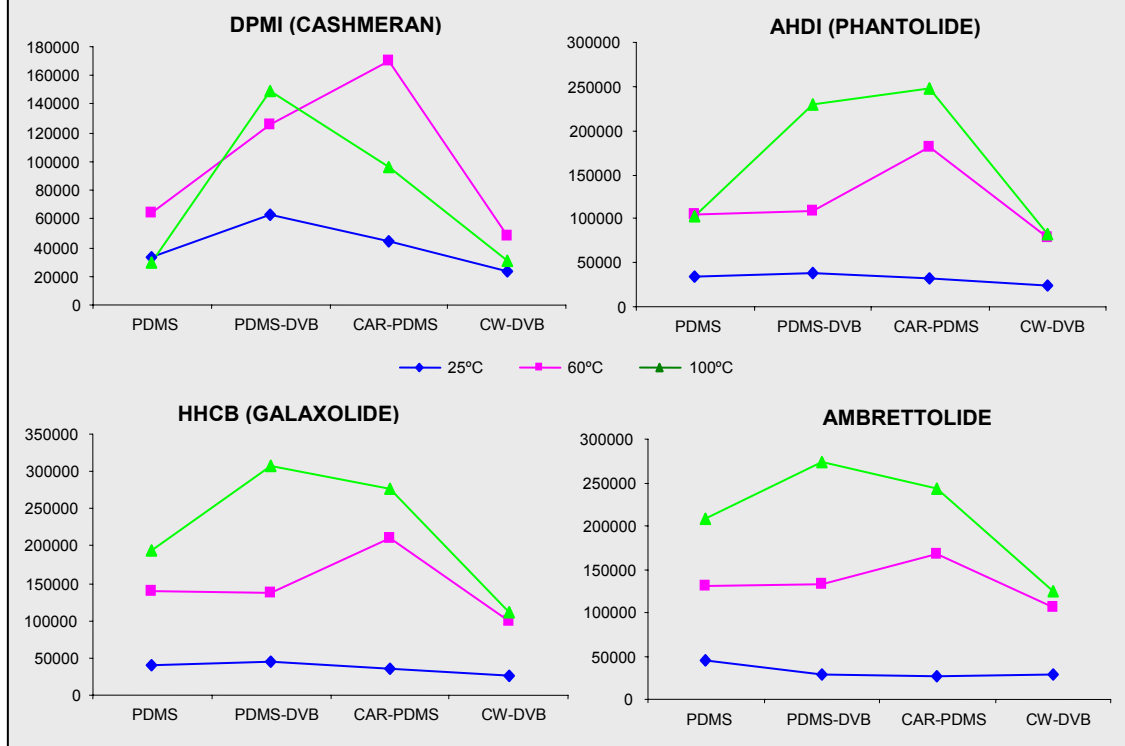
Tal como se observa la temperatura y el modo de muestreo y la interacción entre ambos, fueron factores significativos para todos los compuestos excepto para el DPMI; mientras que el tipo de fibra sólo fue significativo para tres compuestos, DPMI, ADBI y AHDI, que son los más volátiles y polares. Este factor, sin embargo, estuvo muy próximo al nivel de significación para el resto de los compuestos, con la excepción de Ambrettolide.

Para obtener las condiciones experimentales óptimas de los tres factores es necesario un estudio más profundo de los datos. Las gráficas de interacciones reflejan la variación de la respuesta en función de los niveles de dos factores (promediando los niveles del factor no considerado). Observando estas gráficas se pueden extraer conclusiones respecto a qué niveles de los factores proporcionan una mayor respuesta, y además, evaluar las interacciones entre los dos factores, es decir, si un factor ejerce diferente efecto dependiendo del nivel del otro factor.

En la **Figura IV.2.2.2.1.2** se muestran las gráficas de interacción entre los factores fibra-temperatura de muestreo para algunos compuestos que presentan un comportamiento representativo.

En general, los mejores resultados se obtuvieron trabajando a la temperatura más alta, 100°C con CAR-PDMS y PDMS-DVB, mientras que las peores respuestas se obtuvieron a 25°C. Para DPMI, el cual presenta una interacción clara entre factores, aunque sin llegar al nivel de significación (ver **Tabla IV.1.2.2.2.1.3**), las respuestas más altas se consiguieron bajo dos condiciones: a 60 °C con CAR-PDMS y a 100 °C con PDMS-DVB. Sin embargo, dado que 100°C es la mejor temperatura de extracción para el resto de las fragancias, se seleccionó esta temperatura como óptima.

**Figura IV.1.2.2.1.2** Gráficas de interacción fibra-temperatura de extracción (AB) para algunos compuestos representativos (resultados expresados en cuentas de área).



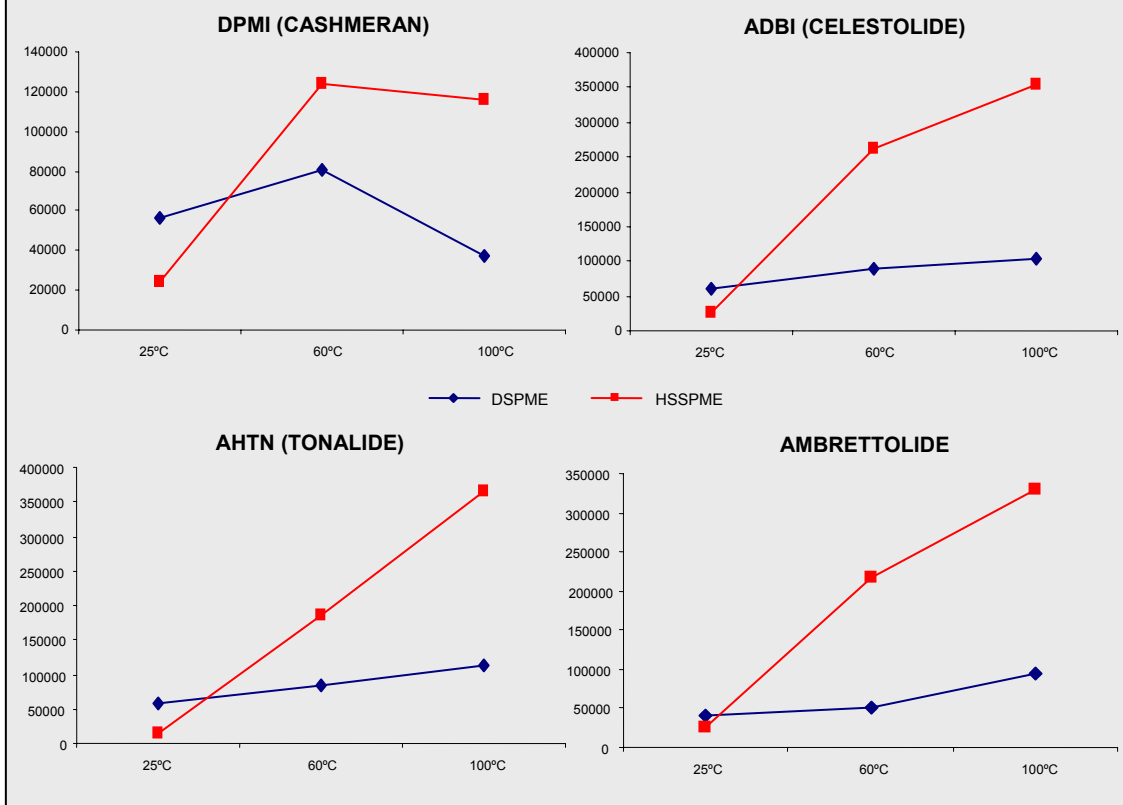
Por otra parte, en la **Figura IV.1.2.2.1.3** se muestran las gráficas de comparación entre los factores temperatura y modo de muestreo, cuya interacción presentó un efecto significativo para la mayoría de los compuestos.

A 25°C la eficacia de extracción fue mayor mediante el muestreo directo (DSPME), sin embargo a temperaturas altas (60°C y 100°C), se alcanzaron mejores eficacias de extracción para HSSPME.

Para todas las fragancias consideradas las respuestas aumentaron con el aumento de la temperatura, tanto para DSPME como para HSSPME, sin embargo para este último modo de muestreo el incremento fue mucho más pronunciado. Este hecho sugiere, que para el muestreo HSSPME, el paso limitante de la cinética de extracción es el paso del analito de la muestra al espacio de cabeza.

La única excepción fue el DMPI, para el cual a 100°C se produjo un descenso en la señal. De hecho, para DSPME la respuesta a 100°C fue peor que a 25°C. Para este compuesto (el de menor peso molecular) parece que los factores termodinámicos (disminución de la constante de distribución con la temperatura) son más importantes que los cinéticos, lo que sugiere que el sistema debe estar en equilibrio a una temperatura menor de 100°C.

**Figura IV.1.2.2.1.3** Gráficas de interacción temperatura de extracción-modo de muestreo (BC) para algunas fragancias representativas (respuestas expresadas en cuentas de área).



De las gráficas de interacciones entre los factores tipo de fibra y modo de muestreo no se obtuvo información adicional a la ya comentada en la Figuras anteriores, por lo que se decidió no incluirlas.

En función de estos resultados, las condiciones seleccionadas para llevar a cabo los siguientes estudios fueron el muestreo del HS a 100°C con PDMS-DVB o CAR-PDMS.

#### IV.1.2.2.2.2. EVALUACIÓN DE OTROS PARÁMETROS EXPERIMENTALES: Volumen de muestra, agitación, efecto salino y efecto memoria.

Aunque, en principio, no se incluyó un número mayor de factores en el diseño experimental, debido a la limitación de éste en cuanto al número de experimentos, posteriormente, se realizaron una serie de experiencias para evaluar el efecto del volumen de muestra, de la agitación y de la adición de sal.

En un sistema de SPME de tres fases, como ocurre en las condiciones experimentales propuestas, el analito está distribuido entre las fases que lo constituyen (la muestra, el espacio de cabeza y la fibra). Por tanto, el volumen de cada una de estas fases tendrá un efecto importante, tanto en la termodinámica del proceso, como en la cinética.

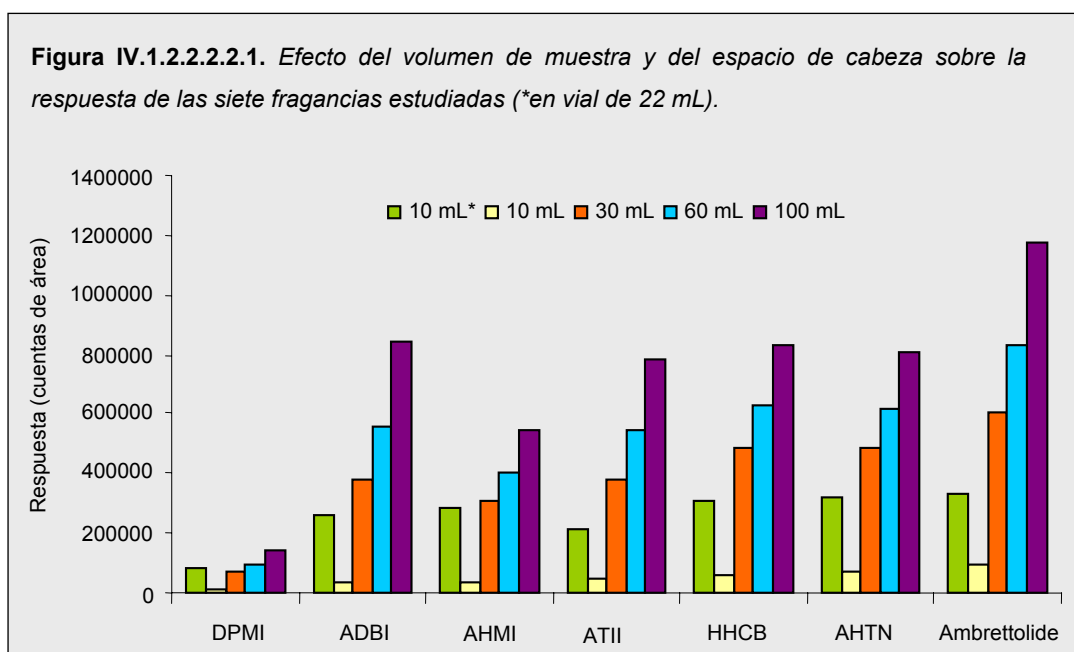
Estos efectos son muy complejos y dependen en gran medida de las constantes de partición de los analitos considerados entre las distintas fases<sup>13-15</sup>. Obviamente, la complejidad del proceso será todavía mayor si el sistema no se encuentra en condiciones de equilibrio.

Considerando sólo los aspectos termodinámicos, el incremento del volumen del HS podría disminuir la respuesta, si la capacidad de esta fase es importante, o no afectar a la misma, si la capacidad de esta fase es despreciable. Por otra parte, la sensibilidad del proceso de microextracción es directamente proporcional a la cantidad de analito, y por tanto, es esperable un aumento de la respuesta con el aumento en el volumen de muestra. Sin embargo, de acuerdo con los fundamentos teóricos, si el volumen de muestra es significativamente mayor que la capacidad de la fibra y del espacio de cabeza, la cantidad de analito extraída por la fibra, y por tanto la respuesta analítica, serán independientes del volumen de muestra (volumen infinito).

Para estudiar el efecto, tanto del volumen de muestra como del volumen de espacio de cabeza, se realizaron distintas extracciones empleando la fibra PDMS-DVB en las condiciones óptimas dadas por el diseño (HSSPME, 100°C), variando el volumen de las muestras acuosas de 10 a 100 mL en viales de 120 mL, pero con la misma concentración de las siete fragancias (20 ng/mL). Además, también se llevaron a cabo experimentos con 10 mL de muestra en viales de 22 mL.

La **Figura IV.1.2.2.2.1** muestra los resultados obtenidos en estas pruebas. Las dos primeras barras de la figura corresponden a la respuesta obtenida para el mismo volumen de muestra pero diferente volumen de HS, 12 y 110 mL, respectivamente.





Como se puede observar, la mayor respuesta se obtuvo para el menor volumen de HS, para todos los compuestos.

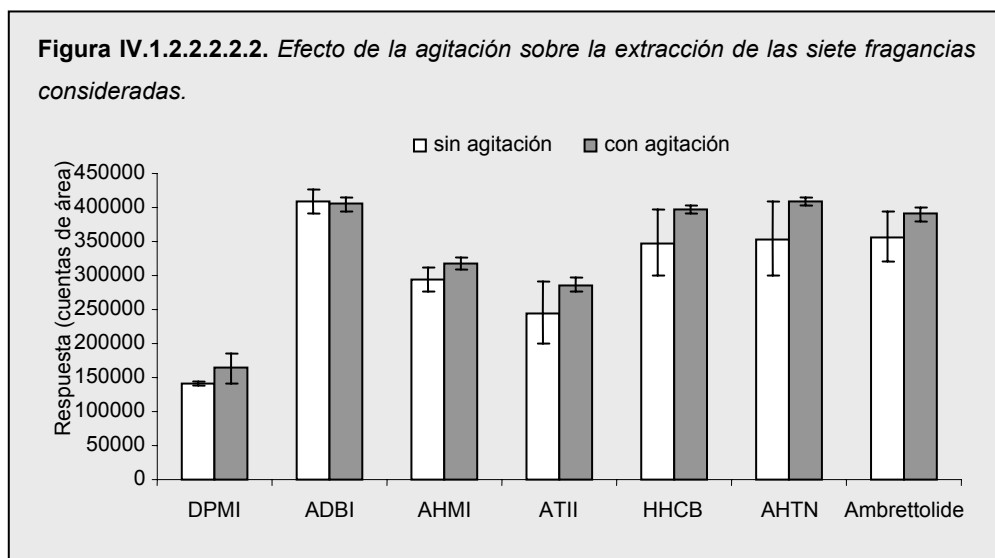
Por otra parte, de la segunda a la última barra se muestran los resultados obtenidos al aumentar el volumen de 10 a 100 mL en un vial de 120 mL, lo que implica un aumento de volumen de muestra y una disminución del volumen de HS. En este caso se observa un importante incremento de la respuesta a medida que aumenta el volumen de muestra. De hecho, la respuesta obtenida para 100 mL es hasta un 60% mayor que la obtenida para 10 mL en vial de 22 mL, excepto para el DMPI y AHMI. Así, si el volumen de muestra disponible es suficiente, se recomienda utilizar un volumen de 100 mL y minimizar el HS, para aumentar la sensibilidad del método.

El proceso de microextracción, además de estar condicionado por el volumen de las fases, lo va estar por la difusión de los analitos entre las mismas. En este sentido, la aplicación de agitación va a incrementar los coeficientes de difusión de los analitos hacia la fibra o de la muestra al HS y disminuir el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, por lo que, sólo va a presentar un efecto significativo si nos encontramos bajo condiciones cinéticas. Además, si la etapa limitante del proceso es la difusión en el propio recubrimiento, no debería verse afectado por la aplicación de agitación.

Por otra parte, en cuanto al modo de extracción, se espera que dicho efecto sea mucho más importante para DSPME que para HSSPME, puesto que los coeficientes de difusión en la fase gaseosa pueden ser hasta cuatro órdenes de magnitud superiores que en el agua<sup>16</sup>.

Para estudiar el efecto de la agitación sobre la extracción de las fragancias mediante HSSPME, se realizaron una serie de experiencias sin y con aplicación de agitación magnética en las que las condiciones de extracción consideradas fueron: muestreo durante 25 min, a 100°C con PDMS-DVB, de 10 mL de muestra en viales de 22 mL.

En la **Figura IV.1.2.2.2.2** se representan los resultados obtenidos en estas pruebas.



El intervalo mostrado se corresponde con la desviación estándar. Se puede comprobar cómo la eficacia de la extracción no se ve afectada significativamente por la agitación. Este resultado indica, o bien, que nos encontramos bajo condiciones de equilibrio, o que la etapa limitante de la extracción no es el paso de los analitos de la matriz al HS, paso que se favorecería con la agitación, sino la difusión de los analitos en la propia fibra.

Otro parámetro experimental que puede presentar una influencia importante en la extracción de los compuestos es el efecto salino. La evaluación del efecto de la adición de sal sobre la HSSPME de los compuestos se realizó mediante la extracción por duplicado de muestras acuosas sin sal y muestras con un 20% peso/volumen de sal (NaCl). Las condiciones de extracción que se emplearon fueron el muestreo con PDMS-DVB y CAR-PDMS durante 25 min, a 100°C, de 10 mL de muestra en viales de 22 mL. Los resultados obtenidos con ambas fibras, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, mediante el programa Statgraphics® Plus, para determinar la significación estadística del efecto salino en la respuesta<sup>6</sup>.

En la **Tabla IV.1.2.2.2.2**, se recogen los valores de F y de p obtenidos para este estudio.

**Tabla IV.1.2.2.2.2** Valor de *F* y valor de *p* para el ANOVA aplicado al estudio del efecto salino.

Compuestos	PDMS-DVB		CAR-PDMS	
	valor-F	valor-p	valor-F	valor-p
DPMI	0.39	0.65	2.43	0.36
ADBI	1.28	0.46	2.53	0.36
AHDI	0.73	0.55	62.7	0.08
ATII	1.15	0.48	2.34	0.37
HHCB	1.66	0.42	3.19	0.32
AHTN	7.11	0.23	107	0.06
Ambrettolide	1.41	0.45	3.21	0.32

Dado que el valor de *p* para *F* es mayor de 0.05 para todos los compuestos con ambas fibras, se concluye que no existe una diferencia significativa entre la respuesta obtenida sin adición y con adición de sal.

De los pocos trabajos publicados sobre la SPME de fragancias, sólo en uno se estudió el efecto de la adición de sal<sup>4</sup>. Los autores encontraron un descenso en las eficacias de extracción de hasta un 60% con el incremento en el contenido de sal (entre 0 y un 20% p/v), y comprobaron que esta observación no se debía a las pérdidas por adsorción de las fragancias en las paredes del vial. Puesto que el método que proponen se basa en el muestreo directo, es de suponer que este efecto negativo de la sal, se debe a una ralentización de la cinética de extracción al aumentar la viscosidad de la disolución acuosa, por tanto la difusión de los analitos en la matriz juega un papel fundamental en el proceso de microextracción. En el caso de la HSSPME, no se observa este efecto, lo que nos inclina a pensar, tal como se intuía en las pruebas de agitación, que la etapa limitante del proceso de microextracción, no es el paso de los analitos de la muestra al HS, sino la difusión en el propio recubrimiento polimérico.

Por último, se decidió evaluar el posible efecto memoria, teniendo en cuenta que las dos fibras consideradas CAR-PDMS y PDMS-DVB, presentan un recubrimiento de tipo heterogéneo, y en este tipo de recubrimientos la desorción completa de los compuestos más pesados (compuestos con más de 12 C) resulta difícil.

Para estudiar el efecto memoria, se prepararon muestras acuosas con una adición de 500 pg/mL. Las extracciones se llevaron a cabo en HS con ambas fibras, CAR-PDMS y PDMS-DVB. Después de la desorción en el cromatógrafo de gases (2 min), se inyectaron de nuevo cada una de las fibras, para realizar el análisis de lo pudiera haber quedado en las mismas. En estos análisis se detectaron la mayoría de los compuestos, excepto el DMPI con la fibra de PDMS-DVB. La respuesta obtenida se comparó con la respuesta obtenida para las muestras acuosas. En general, se observó un aumento del efecto memoria con el aumento en el peso y en la lipofilia de los compuestos. Aún así, para PDMS-DVB, el efecto memoria fue inferior a un uno por mil, incluso para Ambrettolide. Para la fibra CAR-PDMS el efecto de memoria se encontró entre 3-5 por mil, con excepción de la Ambrettolide (25 por mil).

#### IV.1.2.2.3 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO PROPUESTO

##### IV.1.2.2.3.1 Condiciones experimentales

Tras analizar todos los datos obtenidos en la optimización del proceso de microextracción, se evaluaron las características analíticas del método propuesto, cuyas condiciones experimentales se resumen en la **Tabla IV.1.2.2.3.1**, considerando los dos recubrimientos que resultaron más adecuados en la extracción de las fragancias (PDMS-DVB y CAR-PDMS).

**Tabla IV.1.2.2.3.1.** *Condiciones experimentales del método de SPME propuesto para la determinación de seis fragancias policíclicas y una macrocíclica en muestras de agua.*

Parámetro	Valor
Fibra	PDMS-DVB y CAR-PDMS
Temperatura	100°C
Modo de muestreo	HSSPME
Volumen de muestra	100 mL
Volumen del vial	120 mL
Agitación	no
Adición de sal	0%
Tiempo de extracción	25 min

##### IV.1.2.2.3.2. Linealidad

El empleo de la SPME como herramienta analítica cuantitativa, se basa en la proporcionalidad directa que existe entre la cantidad de analito inicialmente presente en la muestra y la cantidad extraída por la fibra, siempre y cuando no se produzcan fenómenos de competición entre los analitos, y tanto si el sistema esta en equilibrio como bajo condiciones cinéticas.

Para evaluar la linealidad del método, se realizaron estudios de calibración para las fibras CAR-PDMS y PDMS-DVB

Para ello, se emplearon disoluciones acuosas de agua Milli-Q con concentraciones desde los 2 pg/mL a los 2000 pg/mL, con cuatro niveles intermedios y en las condiciones de

trabajo establecidas en la **Tabla IV.2.2.3.1**. Cada nivel de calibrado se analizó por duplicado y dos de ellos por triplicado para evaluar la repetibilidad del método.

En la **Tabla 1.2.2.3.2** se recogen los intervalos de concentración para cada compuesto y los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) para el análisis de regresión de la respuesta correspondiente.

**Tabla IV.1.2.2.3.2.** Intervalo de concentraciones y coeficientes de correlación obtenidos en el estudio de la linealidad del método utilizando las fibras PDMS-DVB y CAR-PDMS.

Compuesto	Intervalo de concentración (pg/mL)	Coeficiente de correlación ( $R^2$ )	
		PDMS-DVB	CAR-PDMS
DPMI	2.76-2256	0.9989	-
ADBI	2.70-2252	0.9990	0.9985
AHDI	2.75-2090	0.9990	0.9991
ATII	2.47-1880	0.9977	0.9991
HHCB	3.01-2510	0.9986	0.9989
AHTN	2.87-2396	0.9999	0.9999
Ambrettolide	3.02-2516	0.9968	0.9973

Como se muestra en la tabla, los valores de  $R^2$  fueron superiores a 0.996 para todos los compuestos, lo que nos indica que el modelo lineal se ajusta a la relación que existe entre la cantidad de analito extraída y la que se encuentra inicialmente en la muestra para el rango de concentraciones estudiado. No se encontraron diferencias en cuanto a la linealidad con ambas fibras.

#### IV.1.2.2.3.3 Precisión

Tal como se mencionó, la precisión del proceso se evaluó a dos niveles de concentración calculando la desviación estándar relativa (RSD) de tres réplicas para cada nivel.

En la **Tabla IV.1.2.2.3.3** se muestran los valores de RSD, que variaron entre 7.7 y 21.0 % para la fibra PDMS-DVB, y entre 2.2 y 17.4 % para la fibra CAR-PDMS. Los valores más altos se obtuvieron para Ambrettolide, que es la fragancia menos volátil y más lipofílica.

**Tabla IV.1.2.2.3.3** Precisiones del método propuesto con ambas fibras para cada una de las fragancias estudiadas.

Compuesto	Repetibilidad (RSD %, n=3)			
	PDMS-DVB		CAR-PDMS	
	10 pg/ml	2000 pg/mL	10 pg/mL	2000 pg/mL
DPMI	9.1	13.2	3.9	7.9
ADBI	8.4	7.9	3.7	6.5
AHDI	9.1	11.1	2.4	0.96
ATII	8.9	13.5	6.9	14.1
HHCB	7.7	10.9	2.2	17.4
AHTN	9.9	15.1	7.2	9.1
Ambrettolide	18.8	21.0	17.9	15.1

#### IV.1.2.2.3.4 SENSIBILIDAD

Los LODs se calcularon como la concentración correspondiente a una señal analítica tres veces superior al ruido de fondo.

En la **Tabla 1.2.2.3.4** se recogen los LODs estimados para las fibras de PDMS-DVB y CAR-PDMS.

**Tabla 1.2.2.3.4** Límites de detección obtenidos mediante HSSPME-GC-MS.

Compuesto	LODs (S/N=3, pg/mL)	
	PDMS-DVB	CAR-PDMS
DPMI	1.7	1.5
ADBI	0.1	0.1
AHDI	0.2	0.3
ATII	0.3	0.3
HHCB	1.2	1.0
AHTN	1.8	1.0
Ambrettolide	4.6	9.0

En todos los casos, el método permite evaluar estos compuestos a niveles de concentración muy bajos. Para Celestolide, Phantolide y Traseolide los LODs fueron inferiores a 1 pg/mL para ambas fibras y para Galaxolide, Tonalide y Cashmeran se encontraron entre 1 y 2 pg/mL. Los LODs más altos fueron para Ambrettolide, aunque inferiores a 10 pg/mL con ambas fibras.

De todos modos, como se comentó al inicio, los LODs deben comprobarse siempre analizando previamente un blanco y revisando la relación señal/ruido obtenida.

## IV.1.2.2.4 Aplicación a muestras reales

El método SPME-GC-MS, una vez optimizado, se aplicó a la determinación de las siete fragancias estudiadas en muestras reales procedentes de una planta de tratamiento de aguas urbanas (EDAR). Además, para la validación del mismo, se analizaron muestras obtenidas en un ejercicio de intercomparación en el que participó el Laboratorio de Química Analítica. Las muestras analizadas se tomaron en los puntos de entrada y salida de la EDAR.

La determinación de la concentración de los compuestos identificados se llevó a cabo por el método de adición estándar, y por el método de calibrado externo.

En la **Tabla IV.1.2.2.4.1** se comparan las concentraciones encontradas para los siete compuestos, en las muestras analizadas, mediante ambos métodos de cuantificación. Además, la muestra de efluente se analizó usando CAR-PDMS y PDMS-DVB, para comprobar la adecuación de ambas fibras al análisis de muestras reales y contrastar sus resultados.

**Tabla IV.1.2.2.4.1** Concentración (en pg/mL) de las fragancias encontradas en las muestras de efluente e influente.

Compuesto	Muestra					
	Efluente <sup>a</sup>		Efluente <sup>b</sup>		Influente filtrado	
	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PDMS/DVB <sup>a</sup>	PDMS/DVB <sup>b</sup>
ADBI	10.0±0.7	10±1	12.3±0.8	10±1	23±2	28±3
AHDI	5.9±0.6	4.8±0.7	6.8±0.7	4.9±0.7	5±1	7±1
ATII	14.6±0.2	13±1	15.8±0.3	12±1	13±1	14±1
HHCB	413±28	502±7	478±32	495±7	818±70	886±76
AHTN	117±1	106±2	124±1	119±2	802±57	810±57

Los resultados se obtuvieron por dos métodos: <sup>a</sup>calibrado externo y <sup>b</sup>adición de estándar.

En las muestras consideradas los niveles de DMPI (PDMS-DVB) y Ambrettolide (PDMS-DVB y CAR-PDMS), fueron inferiores a los LODs del método. El resto de los compuestos fueron detectados y cuantificados, pudiendo comprobar cómo las concentraciones de HHCB y AHTN son muy superiores a las del resto de fragancias.

Las concentraciones de HHCB en esta agua son aproximadamente el triple de las de AHTN, lo que está de acuerdo con las proporciones de uso en productos de limpieza de ambas fragancias (ver **Tabla II.1.1.2.1**).

Una excepción la constituye la muestra de influente filtrado. El hecho de que en esta muestra las concentraciones de HHCB y AHTN fueran del mismo orden, es un indicio de que los fenómenos de adsorción en la materia orgánica para HHCB pueden jugar un papel importante en su eliminación, tal como se apuntaba en el **Apartado II.1.1.3** del Capítulo de Introducción.

Si comparamos las concentraciones obtenidas por el método de adición y por calibrado externo, se comprueba que para el efluente y el influente filtrado los resultados son comparables, confirmando que no existe efecto matriz y que, por tanto, el calibrado externo resulta adecuado para la cuantificación.

En cuanto al tipo de recubrimiento, los resultados obtenidos para la muestra de efluente con ambas fibras también fueron comparables.

Por otra parte, al contrastar los resultados obtenidos para el influente y el efluente, se observa que durante el tratamiento al que se somete el agua, las concentraciones de todas las fragancias se reducen aproximadamente 4 veces.

Finalmente, se analizaron las muestras del ejercicio de intercomparación, en las cuales se detectaron las fragancias ADBI, AHDI y ATII a concentraciones bajas, mientras que las concentraciones para HHCB y AHTN fueron un orden de magnitud mayores, tal como se recoge en la **Tabla IV.1.2.2.4.2**.

**Tabla IV.1.2.2.4.2** Concentraciones de las fragancias detectadas en la muestra de intercomparación (pg/mL): <sup>a</sup>calibrado externo y <sup>b</sup>adición de estándar.

Muestra	DMPI	ADBI	AHDI	ATII	HHCB	AHTN	Ambrettolide
Efluente <sup>a</sup>	<LOD	11.6±1.0	15.8±1.6	9.4±1.1	830±102	213±29	<LOD
Efluente <sup>b</sup>	<LOD	13.2±1.3	17.7±1.7	12.0±1.1	816±83	204±21	<LOD

La valoración de resultados del ejercicio de intercomparación para cada uno de los laboratorios participantes se resume en la **Tabla IV.1.2.2.4.3**.

En ella se presenta de modo cualitativo la concordancia de los resultados obtenidos por los laboratorios con el valor de referencia dado por los organizadores, para Galaxolide y Tonalide, comprobando como los resultados del método propuesto (L1) presentan una desviación inferior al 10%.



**Tabla IV.1.2.2.4.3 Resultados del ejercicio de intercomparación (muestra de efluente)<sup>17</sup>.**

Laboratorio	L1	L2	L3	L6	L7
HHCB	++	++	+	++	++
AHTN	++	+	++	++	++

++.= excelente (desviación entre el valor encontrado y el valor de referencia <10%)

+.= bueno (desviación entre el valor encontrado y el valor de referencia entre 10 - 30 %)

(+).= aceptable, pero necesita mejorar (desviación entre el valor encontrado y el valor de referencia entre 30 - 50 %)

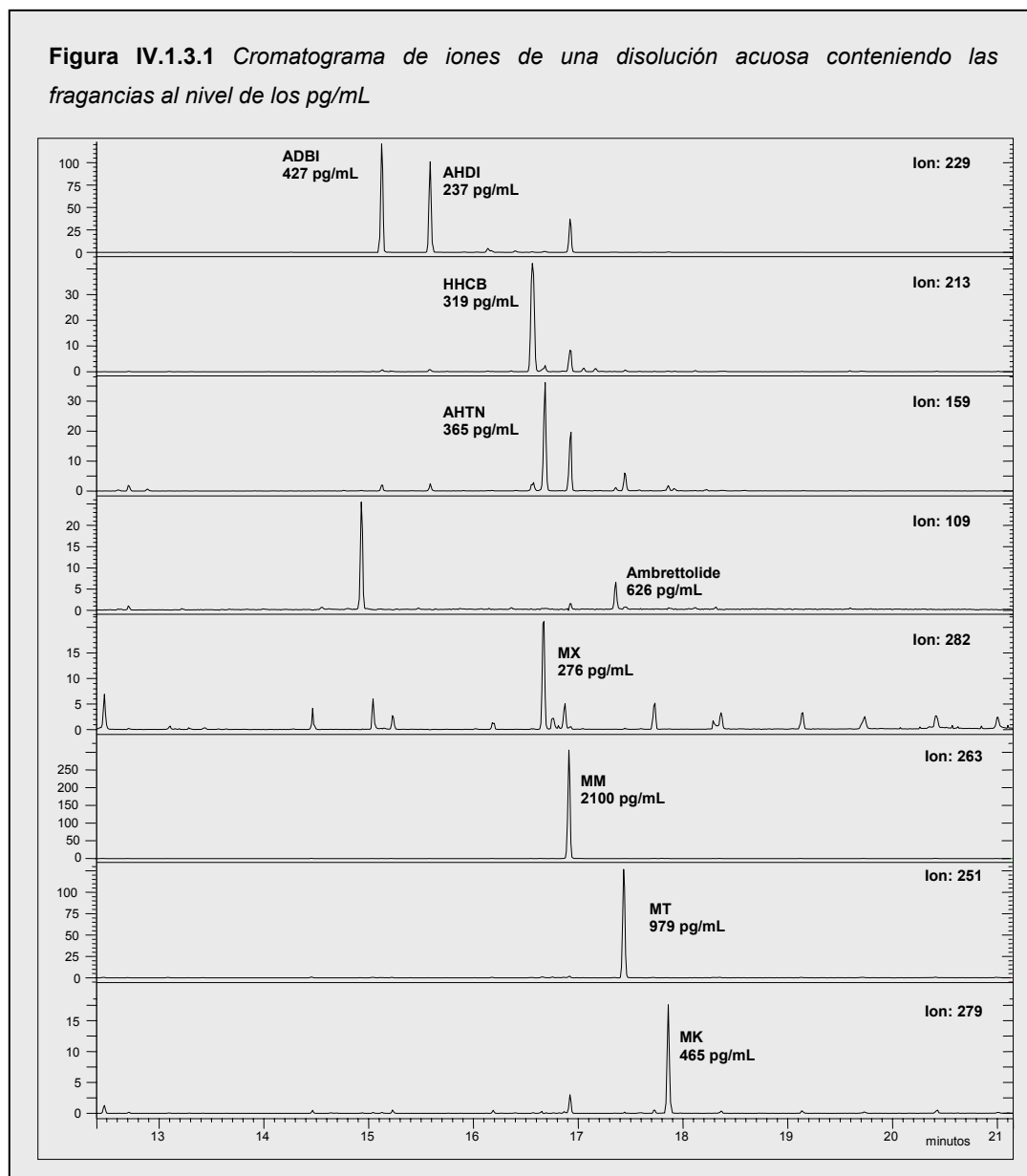
-.= inaceptable (desviación entre el valor encontrado y el valor de referencia entre >50 %)

Se puede concluir que el método de HSSPME desarrollado para la determinación de fragancias policíclicas mostró unos parámetros analíticos de calidad adecuados, siendo aplicable al análisis de aguas residuales en un amplio rango de concentraciones y con unos LODs bajos.

Este estudio ha sido publicado en la revista ***Journal of Chromatography A* 963 (2002) 277**, cuyo artículo se recoge en el Anexo VI.2

### IV.1.3. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE FRAGANCIAS NITROGENADAS Y POLICÍCLICAS.

Las condiciones de extracción que se obtuvieron para el análisis de la familia de las fragancias nitrogenadas (CAR-PDMS o PDMS-DVB, HSSPME y 100°C), coinciden con las obtenidas para las fragancias policíclicas. Por tanto, se podría proponer un método de SPME general para el análisis en conjunto de todas las familias de fragancias empleando GC-MS como técnica de cuantificación y análisis.



En la **Figura IV.1.3.1** se muestran los cromatogramas de iones para el análisis de una disolución acuosa de agua Milli-Q conteniendo 500 pg/mL de tres fragancias policíclicas (ADBI, HHCB y AHTN), una macrocíclica (Ambrettolide) y cuatro fragancias nitrogenadas (MX, MM, MT y MK).

MT y MK). La extracción se realizó en el modo HSSPME a 100°C usando la fibra de CAR-PDMS.

Tal como puede verse en la **Figura IV.1.3.1**, las fragancias consideradas pudieron determinarse simultáneamente.

Además se demostró la validez del método mediante el análisis de muestras reales, en concreto, con el efluente e influente de una EDAR y con muestras de agua residual procedentes de tres puntos del sistema de alcantarillado de la ciudad de Santiago de Compostela (para la conservación y pretratamiento ver **Apartado III.3.**).

Los compuestos que se detectaron se cuantificaron con calibración externa empleando ambas fibras, y en el caso de la muestra más compleja, el influente, también se cuantificaron mediante el método de adición.

Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla IV.2.2.5**.

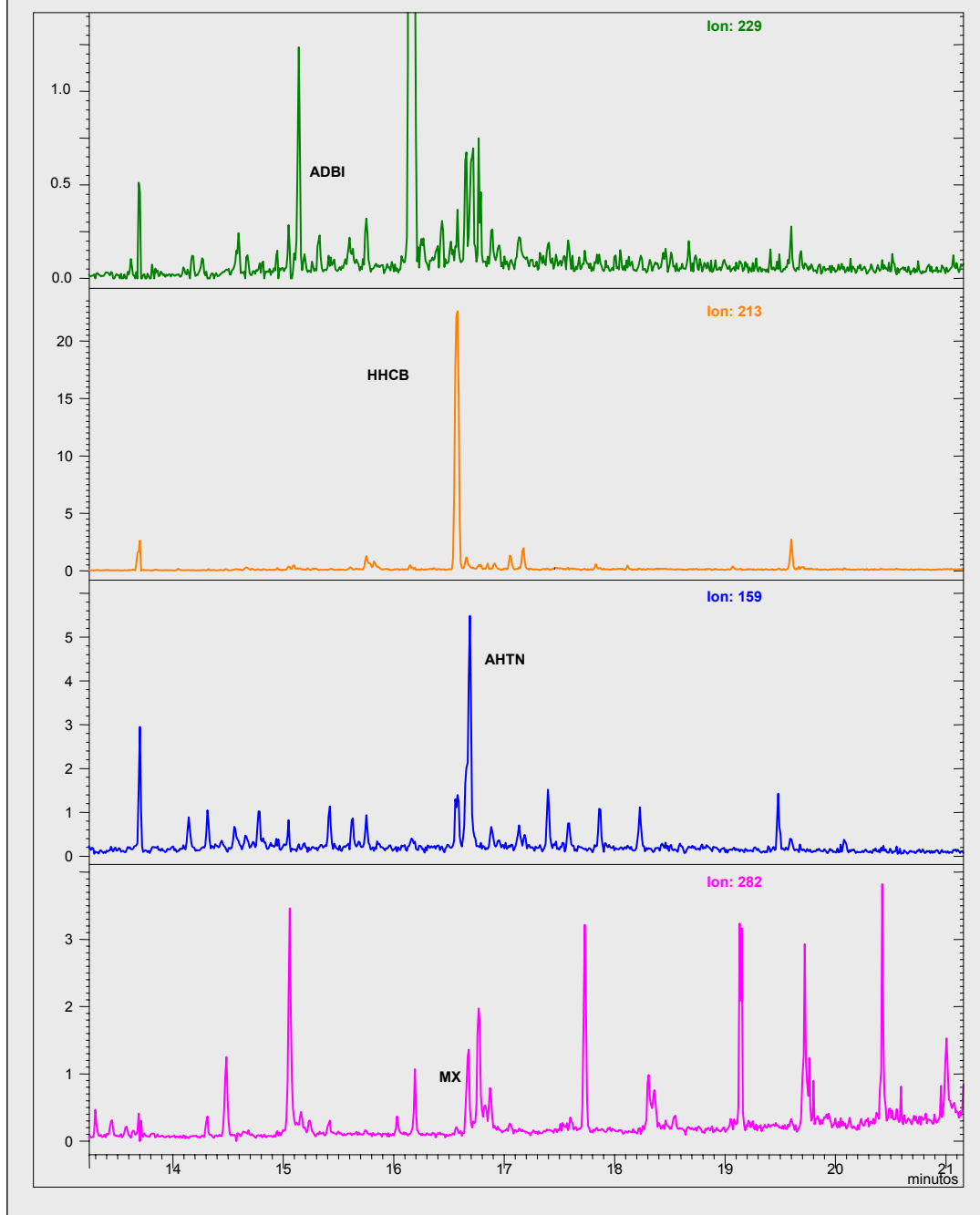
**Tabla IV.1.3.1.** Concentración (pg/mL) de las fragancias detectadas en muestras reales empleando ambas fibras, CAR-PDMS y PDMS-DVB (\* cuantificación por el método de adición).

Muestra	Fibra	ADBI	ATII	HHCB	AHTN	MX
Efluente	PDMS/DVB	<LOD	<LOD	251	40	<LOD
	CAR/PDMS	<LOQ	0.7	234	38	<LOD
Influente	PDMS/DVB	<LOQ	<LOD	875	163	6.7
Influente	CAR/PDMS	5.7±0.7	1.6±0.2	741±25	130±6	7.2±0.1
	CAR/PDMS*	5.6±0.7	1.8±0.2	777±177	143±13	7±1
Colector 1	PDMS/DVB	<LOQ	1.51	745	125	<LOD
	CAR/PDMS	6.4	1.7	704	151	<LOD
Colector 2	PDMS/DVB	<LOQ	<LOD	169	45	19
	CAR/PDMS	<LOQ	<LOD	156	53	15
Colector 3	PDMS/DVB	<LOD	<LOD	51	18	<LOD
	CAR/PDMS	<LOD	<LOD	56	15	<LOD

Los compuestos que se detectaron en los diferentes tipos de agua fueron ADBI, ATII, HHCB, AHTN y MX. En general las concentraciones fueron bajas, entorno a pg/mL, y sólo HHCB y AHTN se encontraron a concentraciones elevadas. Para el influente, los resultados con ambos método de cuantificación fueron consistentes por lo que se confirmó de nuevo que la calibración externa resulta aceptable para la cuantificación. Por otra parte, las concentraciones con ambas fibras también fueron comparables siendo cualquiera de ellas adecuada para este tipo de análisis.

La **Figura IV.1.3.2** muestra el cromatograma de iones para una muestra de agua residual tomada en un colector urbano, en la que se pudieron detectar cuatro fragancias: ADBI, HHCB, AHTN y MX.

**Figura IV.1.3.2.** Cromatogramas de iones para una muestra de agua residual tomada en un colector urbano.



Con este estudio, se ha demostrado la posibilidad del análisis simultáneo de los distintos tipos de fragancias mediante un único método basado en HSSPME/GC/MS.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) W.M.G.M. van Loon, M.E. Verwoerd, F.G. Wijnker, C.J. van Leeuwen, P. van Duyn, C. van deGuchte, J.M.L. Hermens, *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (1997) 1358.
- (2) E.J. van de Passche, F. Balk. Environmental risk assesment of the polycyclic musks AHTN and HHCB according to the EU-TGD. RIVM report no. 601 503 008. National Institute of Public Health and the Environment Bilthoven, The Netherlands (1997).
- (3) T. Heberer, S. Gramer, H.J. Stan, *Acta Hydrochim. hydrobiol.* 27 (1999) 150.
- (4) M. Winkler, J.V. Headley, K.M. Peru, *J. Chromatogr. A* 903 (2000) 203.
- (5) Varian, Inc. Saturn GC/MS Workstation. Version 5.4. Software Reference: Operator's Manual. Varian Analytical Instruments. Walnut Creek, California. 1999.
- (6) Statgraphics-Plus, Diseño experimental, Apéndice C, Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA, 2003.
- (7) S.L. Simonich, W.M. Begley, G. Debaere, W.S. Eckhoff, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 954.
- (8) P.S. Spencer, M.C. Bischoff-Fenton, O.M. Moreno, D.L. Opdyke, R.A. Ford, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 75 (1984) 571.
- (9) S. Apostolidis, T. Chandra, I. Demirhan, J. Cinalt, H.W. Doerr, A. Chandra, *Anticancer Res.* 22 (2002) 2657.
- (10) J. Hajslova, P. Gregor, V. Chladkova, K. Alterova, *Organohal. Comp.* 39 (1998) 253.
- (11) K. Bester, H. Hühnerfuss, W. Lange, G. G. Rimkus, N. Theobald, *Wat. Res.* 32 (1998) 1857.
- (12) A. M. Peck, K. C. Hornbuckle. *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 367.
- (13) J.J. Langelfeld, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, *Anal. Chem.* 68 (1996) 144.
- (14) T. Gorecki, J. Pawliszyn, *Analyst* 122 (1997) 1079.
- (15) T. Gorecki, A. Khaled, J. Pawliszyn, *Analyst* 123 (1998) 2819.
- (16) P. Landin. M. Llompart, M. Lourido, R. Cela, *J. Microcol. Sep.* 13 (2001) 275.

(17) Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse. Project acronym POSEIDON. Contract No. EVK1-CT-2000-00047. Project co-ordinator: Dr. Thomas Ternes. Detailed REPORT related to the overall project duration: January 1st, 2001–June 30th, 2004. Workpackage leader: Thomas A. Ternes, Marie-Laure Janex-Habibi, Thomas Knacker, Norbert Kreuzinger, Hansruedi Siegrist. Agosto, 2004.

## IV.2 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE AGUA

Debido a su presencia en una inmensa variedad de productos, los ftalatos pueden encontrarse en concentraciones elevadas en muestras ambientales<sup>1-4</sup>. Como se apuntaba en el **Apartado II.2.1.5.** de legislación aplicable a estos compuestos, algunos de ellos están incluidos dentro de las listas de contaminantes prioritarios de organizaciones nacionales e internacionales<sup>5,6</sup>; estableciéndose ciertos niveles máximos de concentración permitidos. A nivel internacional, la WHO ha establecido un valor límite de 8 ng/mL para DEHP en aguas superficiales y de bebida<sup>7</sup>, que es próximo al nivel máximo admisible de contaminante (MCL) para este compuesto, establecido por la EPA (6 ng/mL)<sup>8</sup>. A nivel europeo, la Directiva comunitaria 2006/0129 (COD) es más restrictiva, ya que establece como norma de calidad ambiental (NCA) el límite de 1.3 ng/mL de concentración media anual para este mismo compuestos en aguas superficiales<sup>6</sup>.

Así, en esta sección de la memoria de Tesis, se decidió estudiar este grupo de contaminantes.

Los procedimientos de extracción más empleados para el análisis de ftalatos en muestras acuosas, son, como en el caso de las fragancias sintéticas la LLE y la SPE, aunque también se han aplicado técnicas como la SPME o LPME<sup>9-11</sup>. En cuanto a la técnica de detección, la mayoría de los métodos se basan en la técnica de GC acoplada a MS, trabajando en el modo de EI<sup>9,10,12,13</sup>. Sin embargo, el principal problema que presenta el análisis de estos compuestos es la contaminación, que puede provenir del material de laboratorio, los sistemas de análisis, los reactivos utilizados e incluso del propio ambiente del laboratorio.

Con el fin de minimizar la manipulación de la muestra, el método de determinación desarrollado en este estudio se basó en la SPME acoplada a la GC-MS, prestando especial atención a los aspectos metodológicos encaminados a minimizar el problema de la contaminación. Dadas las ventajas de la aplicación del diseño multifactorial en la optimización del método, se decidió seguir la misma estrategia que la utilizada en el estudio de las fragancias sintéticas. Los resultados obtenidos se discuten en los siguientes apartados.

**IV.2 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE AGUA**

<b>IV.2.1 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>179</b>
<i>IV.2.1.1 Patrones y muestras.....</i>	<i>179</i>
<i>IV.2.1.2 Precauciones para evitar la contaminación.....</i>	<i>180</i>
<i>IV.2.1.3 Procedimiento de microextracción en fase sólida.....</i>	<i>180</i>
<i>IV.2.1.4 Condiciones instrumentales de medida.....</i>	<i>182</i>
<b>IV.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>183</b>
<b><i>IV.2.2.1 Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas.....</i></b>	<b><i>183</i></b>
<b><i>IV.2.2.2 Optimización del proceso de microextracción.....</i></b>	<b><i>184</i></b>
<i>IV.2.2.2.1. Diseño multifactorial categórico: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.....</i>	<i>184</i>
<i>IV.2.2.2.2 Evaluación de otros parámetros experimentales: Agitación, efecto salino y tiempo de extracción.....</i>	<i>190</i>
<b><i>IV.2.2.3 Parámetros analíticos de calidad del método propuesto.....</i></b>	<b><i>194</i></b>
<i>IV.2.2.3.1 Condiciones experimentales.....</i>	<i>194</i>
<i>IV.2.2.3.2 Blanco de agua.....</i>	<i>194</i>
<i>IV.2.2.3.3 Linealidad.....</i>	<i>196</i>
<i>IV.2.2.3.4 Precisión.....</i>	<i>196</i>
<i>IV.2.2.3.5 Sensibilidad.....</i>	<i>197</i>
<b><i>IV.2.2.4 Análisis de a muestras reales.....</i></b>	<b><i>198</i></b>



## IV.2.1 PARTE EXPERIMENTAL

### IV.2.1.1 Patrones y muestras

Para la preparación de patrones, se partió de productos sólidos comerciales de ftalato de dimetilo (DMP, >98%) y de ftalato de dietilo (DEP, >98%), suministrados por Fluka Chemika (Buchs, Suiza); y el ftalato de di-n-butilo (DBP, >98%) y el ftalato de di (2-etilhexilo) (DEHP, >99%), por Sigma (S. Luis, MO, EEUU). El ftalato de bencilbutilo (BBP, 97.2%) y el ftalato de di-n-octilo (DOP, 99.7%) se obtuvieron de Riedel-de Hën (Seelze-Hannover, Alemania) y Supelco (Bellefonte, PA, EEUU), respectivamente.

A partir de los productos comerciales se prepararon disoluciones patrón individuales en acetona, con una concentración aproximada de 20000 µg/mL.

A partir de estas disoluciones concentradas se prepararon por dilución, disoluciones de trabajo individuales, de aproximadamente 200 µg/mL, y disoluciones mezcla de los seis compuestos, con concentraciones aproximadas de 2 µg/mL y 4 ng/mL, en diferentes disolventes según la finalidad.

Además en este estudio se emplearon muestra de agua sin adición y con adición de los compuestos utilizando estándares acetónicos, siguiendo el procedimiento general para la preparación de muestras acuosas indicado en el **Apartado III.3**.

En el proceso de optimización del método y en el estudio de los parámetros analíticos de calidad, se emplearon disoluciones de agua ultrapura, especial para análisis medioambiental de trazas orgánicas e inorgánicas, suministrada por J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EEUU).

En los estudios de aplicación del método, se analizaron diferentes muestras de agua que incluyen agua de bebida, en concreto muestras de agua mineral envasada en recipientes de plástico y en recipientes de vidrio, y agua de grifo tomada en el propio laboratorio; muestras de aguas superficiales, agua de río (río Gafos, Pontevedra) y agua de mar (tomada en la proximidad de un puerto industrial, Ferrol); y muestras de agua residual que se obtuvieron de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas situada en las cercanías de Santiago de Compostela (correspondiente a 125000 habitantes), tomadas en la entrada y la salida de la misma, y de un colector urbano situado en la misma ciudad. Antes de su análisis, las muestras

de agua residual se filtraron empleando material de vidrio lavado según el protocolo establecido (ver siguiente apartado).

#### IV.2.1.2 Precauciones para evitar la contaminación

Como ya se mencionó en el capítulo de Introducción, los ftalatos son contaminantes ubicuos, por lo que pueden encontrarse en reactivos, en el material utilizado habitualmente en el laboratorio, así como en los equipos de medida; por lo que, el principal problema que presenta su análisis es la contaminación externa.

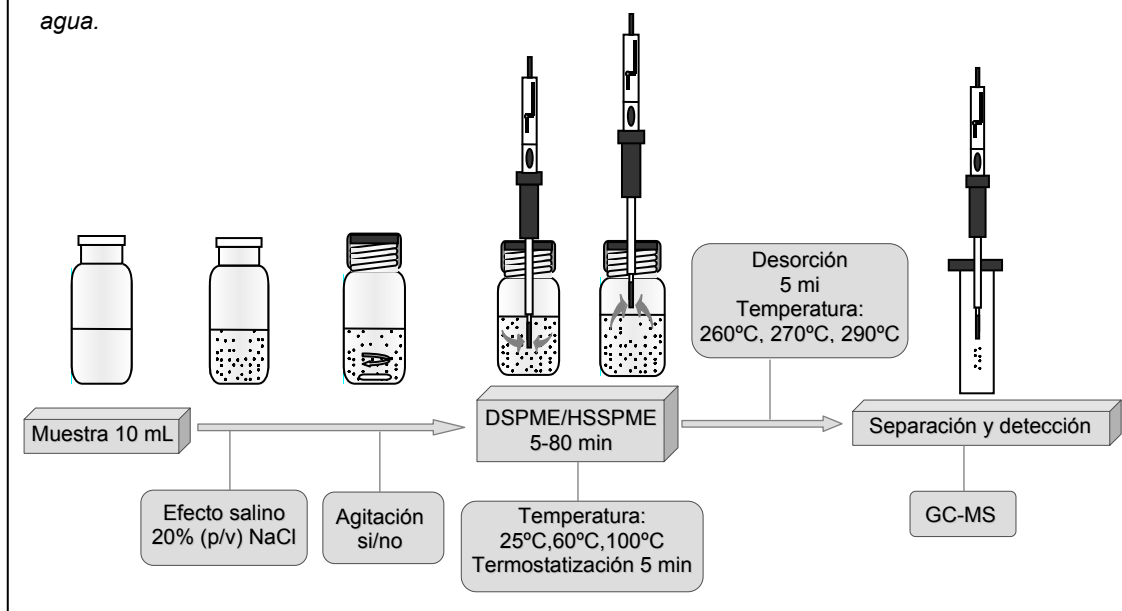
Por tanto, la obtención de blancos y la limpieza del material y los reactivos empleados en cada etapa del proceso analítico, son puntos críticos a la hora de desarrollar un método de determinación de ftalatos. En este trabajo se consideraron los siguientes aspectos para minimizar la contaminación:

- Se evitó el uso de cualquier tipo de material plástico.
- Se simplificó al máximo el procedimiento experimental, empleando los mínimos pasos y la menor cantidad de material, siempre de vidrio, posible.
- Todo el material de vidrio utilizado se lavó antes de su uso con agua ultra pura, especial para análisis de trazas, y se mantuvo a 250°C hasta el momento de su utilización.
- Se chequearon los reactivos y los disolventes orgánicos empleados, ya que incluso los disponibles para análisis de trazas pueden presentar contaminación por ftalatos.
- Se evitó el contacto de las muestras y del material lavado con el ambiente del laboratorio, trabajando en una cámara limpia, envolviendo el material en papel de aluminio y sólo abriendo los envases de las muestras en el momento justo de su utilización. Además, en el procedimiento de SPME, los septa utilizados para sellar los viales con la muestra se recubrieron con papel de aluminio.
- Por último, en cuanto al sistema cromatográfico, las fuentes de contaminación más importantes, se localizan en el inyector y el sistema suministrador de gases. Éstos se chequearon mediante blancos de análisis diarios. Además, como precaución se cambiaron el septum y el liner del inyector antes de empezar una jornada de trabajo.

#### IV.2.1.3 Procedimiento de microextracción en fase sólida

La extracción y concentración de los ftalatos en las muestras de agua se realizó siguiendo el esquema que aparece en la **Figura IV.2.1.3**.

**Figura IV.2.1.3.** Esquema del procedimiento de SPME empleado en la determinación de ftalatos en agua.



Alícuotas de 10 mL de muestra se depositaron en viales de espacio de cabeza de 22 mL, los cuales se trataron según el procedimiento indicado en el apartado anterior. En las pruebas en las que fue necesaria la aplicación de agitación, se introdujeron barras magnéticas (previamente limpiadas según el protocolo), y a continuación, los viales se sellaron con cápsulas de aluminio y septa recubiertos por papel de aluminio.

El vial con la muestra se mantuvo en un baño de agua a temperatura controlada durante 5 min, antes de la extracción, para conseguir la temperatura indicada por el experimento (25, 60 o 100°C). Justo antes del análisis la fibra se desorbió a 260-290°C (dependiendo de la fibra utilizada) para eliminar la posible contaminación procedente del laboratorio. Después, se perforó el septum con una aguja, y se expuso la fibra en cuestión al espacio de cabeza o directamente a la muestra.

Los tipos de fibras considerados en este estudio fueron: 85 µm poliacrilato (PA), 100 µm polidimetilsiloxano (PDMS), 75 µm Carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), 65 µm polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) y 65 µm Carbowax-divinilbenceno (CW-DVB).

Una vez finalizado el periodo de extracción (de 5 a 80 min, dependiendo del experimento), la fibra se insertó inmediatamente en el inyector del cromatógrafo de gases, para llevar a cabo el análisis cromatográfico. Considerando la estabilidad térmica de los ftalatos, la temperatura de desorción seleccionada fue la temperatura máxima de trabajo posible para cada tipo de fibra (sin sobrepasar los 290°C), con el objetivo de conseguir la máxima respuesta y minimizar los efectos de memoria. La desorción se realizó durante 5 min, a 260°C para la fibra de CW-DVB, 270°C para PDMS y PDMS-DVB y 290°C para PA y CAR-PDMS.

#### IV.2.1.4 Condiciones instrumentales de medida

En el análisis se empleó un cromatógrafo de gases modelo Varian® 3800, provisto de un inyector split/splitless, trabajando en el modo splitless y acoplado a un detector de masas modelo Varian® Saturn 2000 GC-MS, con trampa de iones operando en ionización electrónica (EI). El control del equipo y el procesamiento de la señal se llevó a cabo con el programa informático Varian® Saturn GC-MS, versión 5.4<sup>14</sup>.

Las condiciones de operación del GC-MS, en las que se realizó el desarrollo del método de microextracción, se recogen en la siguiente tabla.

**Tabla IV.2.1.4. Condiciones instrumentales del GC-MS.**

Varian® 3800 (GC)	
Columna	CPSil8 CB low-bleed MS (25mx0.25mmx0.25µm)
Gas portador	He
Tipo de inyector	Split/splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	2 min
Tª del inyector	de 260°C a 290°C según el tipo de fibra
Presión en cabeza de columna	10.4 psi a 60°C
Flujo de split	50 mL/min
Flujo en columna (He)	1.2 mL/min (constante)
Tª de la línea de transferencia	280°C
Programa de Temperaturas	
• Primer Gradiente	
Tª inicial	60°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de temperatura	20°C/min
Tª final	190°C
• Segundo Gradiente	
Tª inicial	190°C
Rampa de temperatura	10°C/min
Tª final	280°C
Tiempo final	5 min
Tiempo total del análisis	22.2 min
Varian® Saturn 2000 (MSD)	
Modo de ionización	EI (ionización electrónica), 70 eV
Voltaje del multiplicador	1750 V
Voltaje de modulación axial	4 V
Tª de la trampa de iones	220°C
Tª del manifold	50°C
Rango de masas	80-300 m/z
Velocidad de escaneado	0.8 s/scan
Corriente de emisión del filamento	30 µA

## IV.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.2.2.1 Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas

Para la identificación de los ftalatos estudiados, se inyectaron patrones individuales en isooctano.

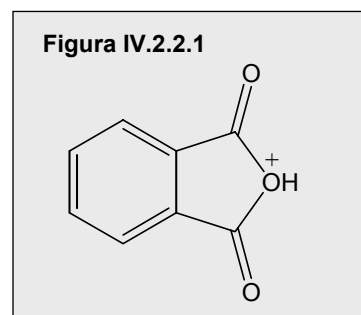
Con el programa de temperaturas recogido en la **Tabla IV.3.1.4** se consiguió evitar que ciertas interferencias de siloxano procedentes de la columna cromatográfica o del recubrimiento polimérico de la fibra coeluyesen con algunos de los ftalatos.

**Tabla IV.2.2.1** *Tiempos de retención, iones de cuantificación e iones de identificación para los seis ftalatos estudiados.*

Compuesto	$t_R$ (min)	Iones de cuantificación	Iones de identificación
DMP	8.31	163	92,133,163
DEP	9.21	149,176,177	93,105,149,177,223
DBP	11.93	149,205	149,205,223
BBP	15.06	149,206	91,104,149,206
DEHP	16.15	149,167	149,167,279
DOP	17.90	149,279	149,279

La elección de los iones característicos más adecuados para la cuantificación de cada especie, se realizó en función de la relación señal / ruido obtenida para cada ión (o suma de iones).

Tal como se puede ver en la **Tabla IV.2.2.1**, el ión 149 fue característico de todos los ftalatos estudiados (menos para el DMP), correspondiendo al anhídrido ftálico protonado (ver **Figura IV.2.2.1**), que se forma por fragmentación y reestructuración del ftalato<sup>17</sup>.



Como ya se ha comentado las fuentes de contaminación por ftalatos pueden encontrarse en cualquier punto del proceso analítico. Para chequear la presencia de ftalatos en

el sistema cromatográfico (principalmente en el inyector), se realizaron blancos de columna e inyecciones de isooctano. No se detectó la presencia de ftalatos en ninguna de estas experiencias.

Además, ante de comenzar con la optimización de la SPME, se realizaron inyecciones de las diferentes fibras empleadas sin haber estado expuestas a ninguna muestra. En este caso sí que se detectó la presencia de ftalatos. Para evitar este problema de fondo, las fibras se desorbieron a 270°C justo antes de realizar las extracciones. De este modo, se consiguieron blancos satisfactorios, por lo que, este pre-acondicionamiento de las fibras se empleó sistemáticamente en todos los experimentos descritos.

#### IV.2.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROEXTRACCIÓN

##### IV.2.2.2.1. DISEÑO MULTI-FACTORIAL CATEGÓRICO: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.

Con el fin de conocer el grado de influencia de los tres parámetros más importantes en el proceso de microextracción de los ftalatos y sus valores óptimos, se siguió una estrategia de optimización multivariada basada en un diseño experimental.

En este caso, se incluyó el estudio del tipo de recubrimiento de fibra en el diseño, considerando los siguientes tipos de recubrimientos poliméricos: PDMS (100 µm), PDMS-DVB (65 µm), PA (85 µm), CAR-PDMS (75 µm) y CW-DVB (65 µm). Además, se incluyeron el estudio de la temperatura de extracción a tres niveles (25, 60 y 100°C), y el modo de muestreo (directo, SPME, y en espacio de cabeza, HSSPME).

Se seleccionó un diseño factorial completo (*Multi-factor categorical Design*) 5\*3\*2 de resolución V, el cual consiste en todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores, lo que implica la realización de 30 experiencias<sup>18</sup>. La ventaja que presenta este diseño es que permite evaluar los efectos principales, así como las interacciones entre factores, que en muchos casos pueden tener efectos importantes en la respuesta.

En todas las experiencias se emplearon alícuotas de muestra de 10 mL a un nivel de concentración de 4 ng/mL, muestreadas en viales de 22 mL durante 20 minutos, aplicando agitación magnética. El tiempo de extracción se fijó de forma que se consiguiese el máximo rendimiento teniendo en cuenta el tiempo necesario para el análisis cromatográfico.

Los datos (respuesta analítica para cada compuesto en cuentas de área) que se obtuvieron tras la realización de los 30 experimentos propuestos por el diseño, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), con el fin de conocer en que medida contribuyen los tres factores estudiados y sus interacciones a la varianza de la respuesta<sup>18</sup>.

Los resultados del ANOVA se recogen en la **Tabla IV.2.2.2.1.1**.

Con el objetivo de simplificar la interpretación de los mismos sólo se han incluido los valores de F y los valores de p. El valor de F nos da una idea de la contribución de cada factor o interacción en la varianza de la respuesta para cada compuesto, y el valor de p prueba la significación estadística de estos efectos.

**Tabla IV.2.2.2.1.1** Resultados del ANOVA para los seis ftalatos estudiados, mostrando la significación estadística de los factores principales y sus interacciones.

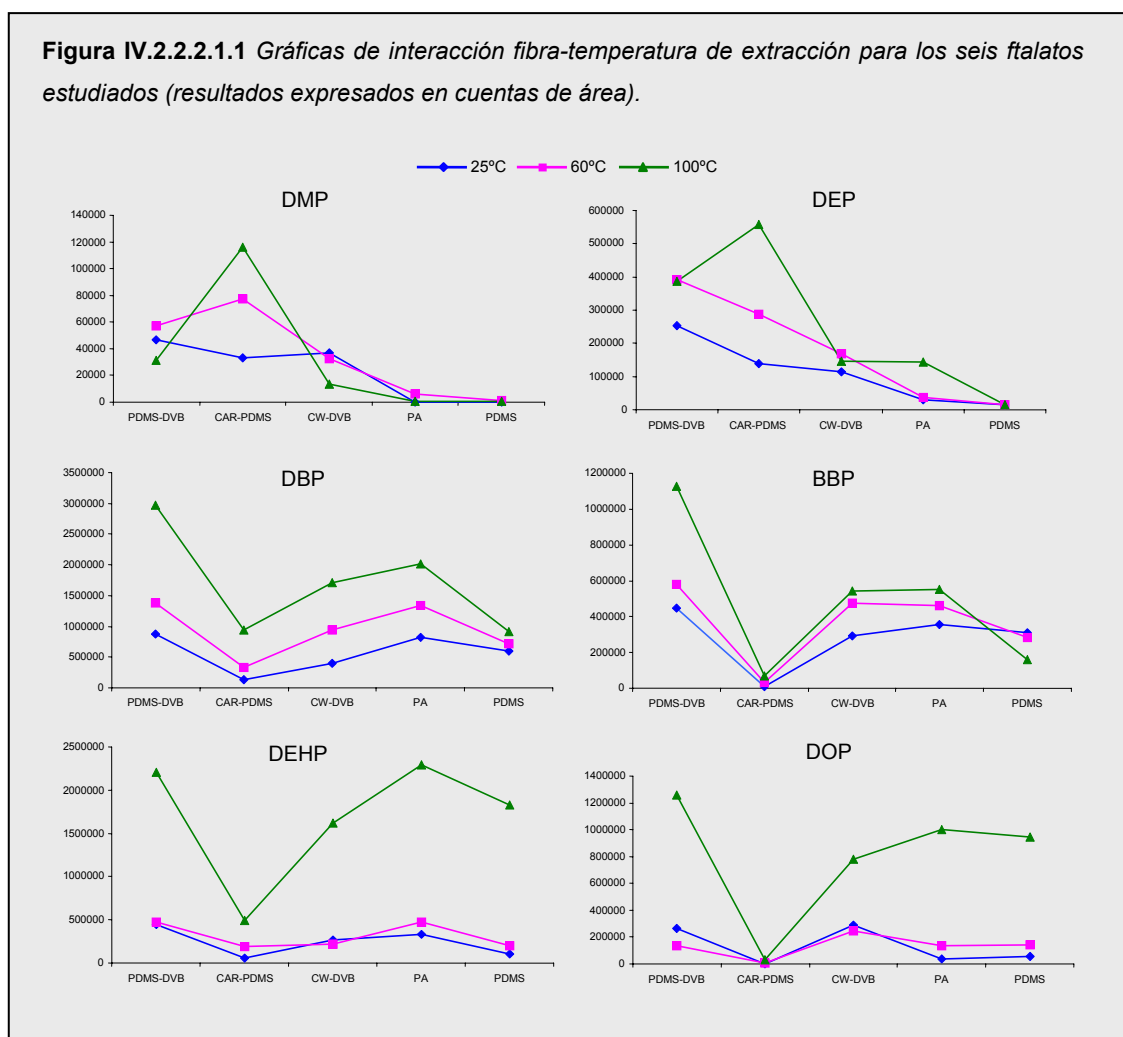
Compuesto	Fuente	Efectos principales			Interacciones		
		A: Fibra	B: Temperatura	C: Modo de extracción	AB	AC	BC
DMP	F-ratio	10.31	0.65	26.48	1.62	5.57	0.84
	p-ratio	<b>0.00</b>	0.55	<b>0.00</b>	0.25	<b>0.02</b>	0.47
DEP	F-ratio	14.99	5.49	44.38	1.76	8.10	1.08
	p-ratio	<b>0.00</b>	<b>0.03</b>	<b>0.00</b>	0.22	<b>0.01</b>	0.38
DBP	F-ratio	20.09	44.33	90.63	3.16	6.41	8.59
	p-ratio	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.06	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
BBP	F-ratio	8.15	2.29	77.44	1.14	4.47	0.92
	p-ratio	<b>0.01</b>	0.16	<b>0.00</b>	0.43	<b>0.01</b>	0.44
DEHP	F-ratio	3.33	35.13	5.83	1.35	0.55	20.96
	p-ratio	0.07	<b>0.00</b>	<b>0.04</b>	0.34	0.71	<b>0.00</b>
DOP	F-ratio	6.66	40.57	0.11	3.17	0.54	10.93
	p-ratio	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	0.74	0.06	0.71	<b>0.01</b>

En negrita aparecen los valores para los factores o interacciones estadísticamente significativos, es decir, los que presentan valores de p menores de 0.05. Como se puede comprobar en la tabla, los tres factores, o al menos dos de ellos, presentaron un efecto significativo para la mayoría de los compuestos. Además las interacciones del modo de muestreo con el tipo de fibra (AC) y con la temperatura (BC), fueron significativas para algunos compuestos. Si consideramos los valores de F, resulta evidente que el factor temperatura juega un papel importante en la extracción de DBP, DEHP y DOP, y el modo de extracción, en la respuesta para DMP, DEP, DBP y BBP. Sin embargo, es imprescindible un estudio más profundo de los resultados del diseño mediante las opciones gráficas, para poder seleccionar adecuadamente las condiciones experimentales óptimas de los tres factores.

Una de las opciones gráficas del diseño seleccionado son las graficas de interacciones que reflejan la variación de la respuesta en función de los niveles de dos factores (promediando

los niveles del factor no considerado). Estas gráficas permiten conocer qué niveles de los dos factores proporcionan una mayor respuesta, además de evaluar si existe interacción entre los dos.

En la **Figura IV.2.2.2.1.1** se muestran las gráficas de respuesta para los factores tipo de fibra y temperatura de muestreo para los seis ftalatos objeto de estudio.



Como se puede ver, para DMP y DEP las mejores condiciones de extracción fueron el muestreo a 100°C usando la fibra de CAR-PDMS, aunque para el resto de los compuestos otras fibras proporcionaron mejores resultados. Así, la respuesta para esta fibra cae a medida que la respuesta para el resto de las fibras aumenta paulatinamente a lo largo de la serie de compuestos. En general, las mejores respuestas se alcanzan trabajando con la fibra de PDMS-DVB a 100°C, aunque para DEHP las respuestas con PA y PDMS-DVB fueron comparables. Además esta fibra fue la segunda más eficiente en la extracción de DMP y DEP.



Las fibras de PDMS-DVB y CAR-PDMS presentan una polaridad intermedia, pero se diferencian en el tamaño de poro. El DVB presenta principalmente poros de tamaño medio. Los mesoporos del DVB son ideales para atrapar analitos de tamaño molecular medio, mientras que el polímero de Carboxen contiene microporos adecuados para extraer moléculas pequeñas<sup>19</sup>. La relación entre el tamaño molecular y la eficacia de extracción de la fibra CAR-PDMS se constata con el hecho de que esta fibra sólo fuese adecuada para la extracción de los dos primeros compuestos (DMP y DEP) con el menor tamaño molecular.

En cuanto al tipo de fibra, también es importante puntualizar que para DOP y, especialmente, DEHP, la respuesta con la mayoría de las fibras fue bastante similar, excepto con CAR-PDMS, por lo que, cualquiera de estas fibras sería adecuada para la extracción de estos dos compuestos.

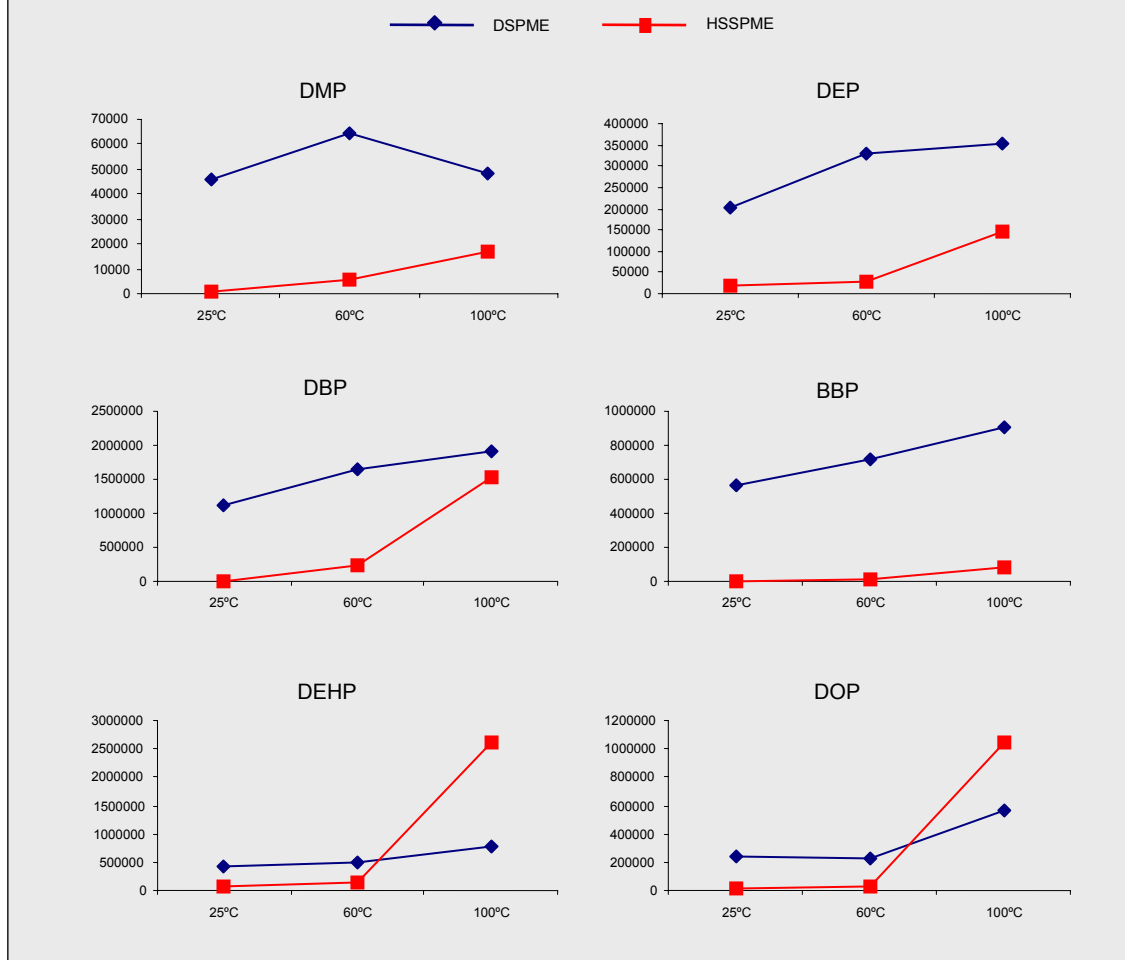
En cuanto a la temperatura de extracción, como ya se comentó, los mejores resultados se obtuvieron trabajando a la temperatura más alta (100°C), sin embargo la influencia de este factor fue más pronunciada para los compuestos menos volátiles, DEHP y DOP. Para estos dos compuestos, las respuestas a 25 y 60°C fueron considerablemente más bajas.

Por otra parte, en la **Figura IV.2.2.2.1.2** se muestran las gráficas de interacción entre los factores temperatura-modo de muestreo, cuya interacción presentó un efecto significativo para los compuestos DBP, DEHP y DOP (ver **Tabla IV.2.2.2.1.1**).

Confirmando los resultados del ANOVA, no se observa una interacción significativa para DMP, DEP y BBP. Para estos compuestos, la eficacia de extracción fue mayor mediante el muestreo directo (DSPME) a cualquier temperatura, aunque, en general, las mejores respuestas se obtuvieron a 100°C. Para el DBP, la DSPME también fue más eficaz que la HSPME a cualquier temperatura, pero el efecto de la temperatura fue mayor sobre la respuesta de HSPME, de ahí que esta interacción fuese significativa en el ANOVA.

Para el DEHP y DOP, se observa una interacción clara entre ambos factores. A 25 y 60°C la respuesta mediante HSPME fue muy baja, por tanto se recomienda trabajar en DSPME, en este intervalo de temperaturas. A 100°C, sin embargo, se produce un incremento muy pronunciado de la respuesta para HSPME, haciendo que éstas sean las mejores condiciones de extracción para estos dos compuestos.

**Figura IV.2.2.2.1.2** Gráficas de interacción temperatura de extracción-modo de muestreo para los ftalatos incluidos en este estudio (respuestas expresadas en cuentas de área).

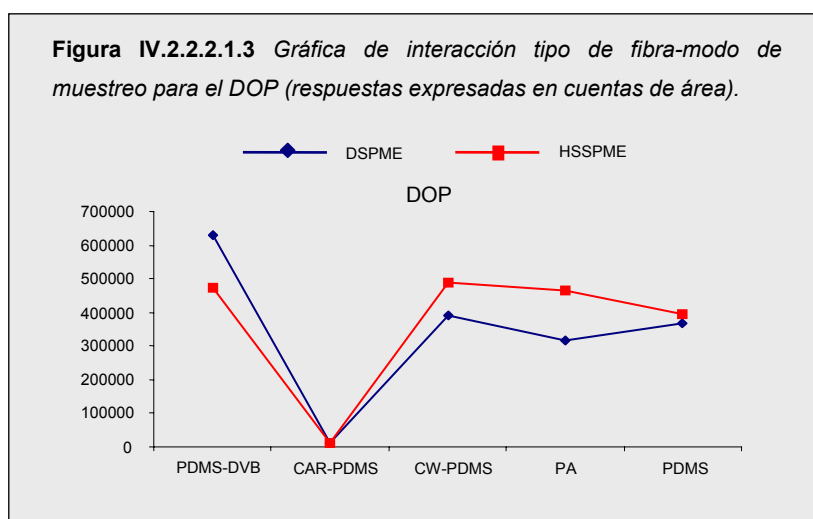


En principio, puede resultar incongruente que los compuestos de mayor peso molecular se extraigan de manera más efectiva del HS y los de menor peso molecular, los más volátiles, mediante la exposición directa. Sin embargo, el fenómeno observado se explicaría si se tienen en cuenta los valores de la constante de Henry (H).

Aunque los compuestos menos pesados presenten mayor volatilidad, debido a su moderada solubilidad en agua, los valores de H son bajos (ver **Tabla II.2.1.1.2**), y por tanto, su paso de la fase acuosa al HS es muy lento. Por el contrario, los compuestos de mayor peso molecular son menos volátiles pero sus valores de H son relativamente altos, lo que provoca que se volatilicen rápidamente sobretodo a temperatura elevada.

Por último, en la **Figura IV.2.2.2.1.3**, se evalúa la interacción entre el tipo de fibra y el modo de muestreo. Sólo se incluye la gráficas para el DOP, ya que para el resto de los compuestos no ofrecen información adicional a las gráficas anteriores.

**Figura IV.2.2.2.1.3** Gráfica de interacción tipo de fibra-modo de muestreo para el DOP (respuestas expresadas en cuentas de área).



En esta figura, la HSSPME aparece como el modo de extracción más efectivo para todas las fibras, excepto para PDMS-DVB; y, aunque las respuestas para cada fibra mediante ambos modos de extracción fueron bastante similares (excluyendo las respuestas de CAR-PDMS), las mejores condiciones se obtuvieron trabajando con esta fibra mediante DSPME.

Como conclusión, en la **Tabla IV.2.2.2.1.2** se muestran las condiciones óptimas extraídas de este estudio para cada compuesto.

**Tabla IV.2.2.2.1.2** Condiciones óptimas para cada compuesto dadas por el diseño factorial categórico 5\*3\*2.

Factor	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DOP
Fibra	CAR-PDMS	CAR-PDMS	PDMS-DVB	PDMS-DVB	PA	PDMS-DVB
Temperatura (°C)	100	100	100	100	100	100
Muestreo	DSPME	DSPME	DSPME	DSPME	HSSPME	DSPME

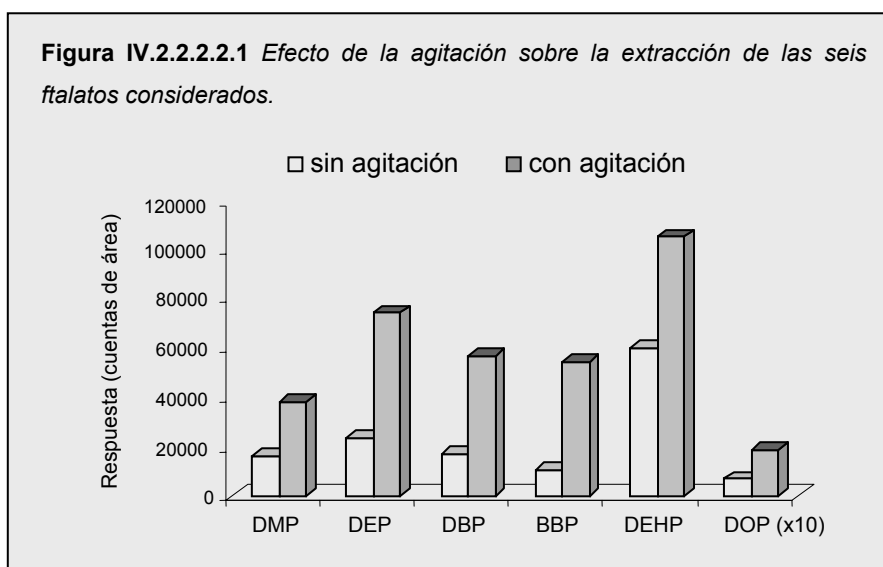
Estas condiciones fueron diferentes dependiendo del compuesto considerado. Por tanto, deben seleccionarse en función del objetivo del trabajo. Si el objetivo se centra sólo en el análisis del DEHP, que es el ftalato de mayor volumen de producción y para el que se han establecido la mayoría de los límites normativos, las mejores condiciones incluirían HSSPME y la fibra de PA. Por otro lado, para los ftalatos más volátiles, como DMP y DEP, CAR-PDMS sería la fibra más adecuada. Si se requiere el análisis simultáneo de los seis ftalatos, como en este caso, las condiciones seleccionadas son, DSPME a 100°C usando la fibra de PDMS-DVB.

#### IV.2.2.2.2 EVALUACIÓN DE OTROS PARÁMETROS EXPERIMENTALES: Agitación, efecto salino y tiempo de extracción.

La agitación magnética de la muestra se incluyó en el diseño como un factor constante para favorecer la difusión del analito entre las fases, incluyendo el paso, tanto desde la muestra acuosa hacia la fibra, como desde la muestra al espacio de cabeza. En principio, sólo se espera que presente un efecto significativo (siempre positivo) si nos encontramos bajo condiciones cinéticas, sin embargo este efecto suele ser más importante para DSPME que para HSSPME, puesto que los coeficientes de difusión en la fase gaseosa pueden ser hasta cuatro órdenes de magnitud superiores que en agua<sup>20</sup>.

Para confirmar el efecto de la agitación sobre la extracción de los ftalatos mediante DSPME, se realizaron una serie de experiencias sin y con aplicación de agitación magnética en las que las condiciones de extracción consideradas fueron, el muestreo directo durante 20 min, a 100°C, de 10 mL de muestra con una concentración de los compuestos de 1 ng/mL, en viales de 22 mL.

En la **Figura IV.2.2.2.1** se representan los resultados obtenidos en estas pruebas.



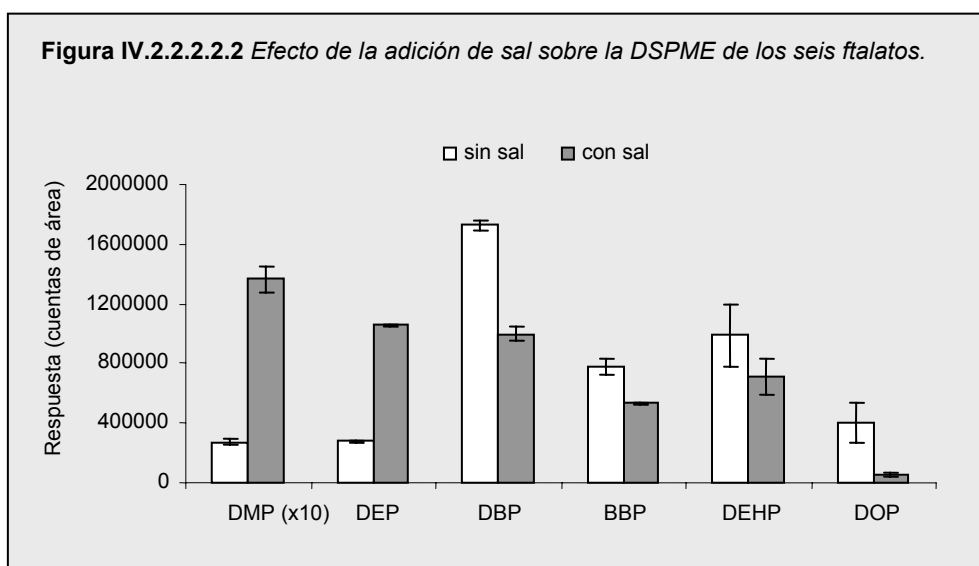
A partir de los resultados, se confirma que la agitación presenta un efecto significativamente positivo sobre la DSPME de todos los ftalatos estudiados.

En el muestreo directo, alrededor del recubrimiento, se establece una capa de agua estacionaria que es la que limita el paso de los analitos desde la disolución hacia la fibra. Ésta

presenta un espesor determinado por los coeficientes de difusión en dicho medio, pero puede verse afectado por factores como la agitación y la viscosidad del medio<sup>19</sup>. La agitación provoca una aceleración de la transferencia de masa de los analitos en la matriz acuosa y por tanto va a disminuir el espesor de esta capa límite. Así, si el sistema se encuentra bajo condiciones cinética, la agitación incrementará la cantidad de analito extraída por la fibra para el mismo tiempo de muestro. De este modo, puede explicarse el que las respuestas de la DSPME de todos los ftalatos hayan aumentado con la agitación, demostrando que la etapa limitante del proceso es la difusión del analito desde la disolución hacia la fibra.

Otro de los parámetros experimentales que no se incluyó inicialmente en el diseño fue la adición de sal, ya que podría suponer una fuente de contaminación de ftalatos y distorsionar los resultados del mismo. De hecho, en los primeros experimentos realizados para evaluar el efecto de este factor, utilizando como sal cloruro sódico (NaCl) envasado en un recipiente plástico, se encontraron serios problemas de contaminación, sobre todo para los compuestos DBP y DEHP.

Tras esta primera experiencia, se decidió trabajar con un reactivo de alta pureza, envasado en recipientes de vidrio. Se confirmó que este reactivo (NaCl) era adecuado para el análisis de ftalatos, sin necesidad de introducir una etapa previa de limpieza con disolventes, mediante la extracción de cierta cantidad de sal con hexano. En el análisis por GC-MS de este extracto concentrado, no se detectó la presencia de ftalatos. Por tanto, el estudio del efecto salino se llevó a cabo mediante la extracción por duplicado de muestras acuosas sin sal y muestras con un 20% peso/volumen de este reactivo (NaCl).



En el gráfico de barras de la **Figura IV.2.2.2.2** se representan los resultados obtenidos. El intervalo mostrado se corresponde con la desviación estándar correspondiente a las réplicas realizadas.

La adición de sal provocó un considerable incremento en la respuesta para el DMP y el DEP, los compuestos más hidrofílicos y de menor peso molecular (según los valores de  $\log K_{ow}$ , ver **Tabla II.2.1.1.2** del Capítulo de Introducción), mientras que para el resto de los compuestos, se observa un descenso en la señal, sobre todo en el caso del DOP.

Como ya se ha comentado, la adición de sal provoca un incremento de la fuerza iónica de la disolución acuosa, de tal manera que las moléculas de agua pasan a solvatar los iones disueltos y no las moléculas neutras del analito<sup>19</sup>. En este sentido, puede favorecer el desplazamiento de los analitos hacia otras fases del sistema, como la fibra. En general, el efecto salino es más efectivo en el caso de los analitos más polares, por ser éstos los que inicialmente se encuentran más solvatados. Para el resto de los compuestos, analitos de muy baja solubilidad y más pesados, la ralentización de la cinética de extracción parece ser la razón del descenso en la respuesta, en concreto para el DOP, que es el de mayor peso molecular. El mismo comportamiento frente a la adición de sal se ha observado para otros contaminantes orgánicos como los PCBs, los PBBs y los PBDEs<sup>21,22</sup>.

Por otra parte, dado que la SPME es una técnica basada en el equilibrio de distribución de los analitos entre las distintas fases que componen el sistema, manteniendo las condiciones experimentales fijas, la eficacia de la extracción vendrá determinada por el tiempo de contacto entre las fases.

En este trabajo, se incluyó el estudio de la influencia del tiempo de extracción en la DSPME de los seis ftalatos considerados.

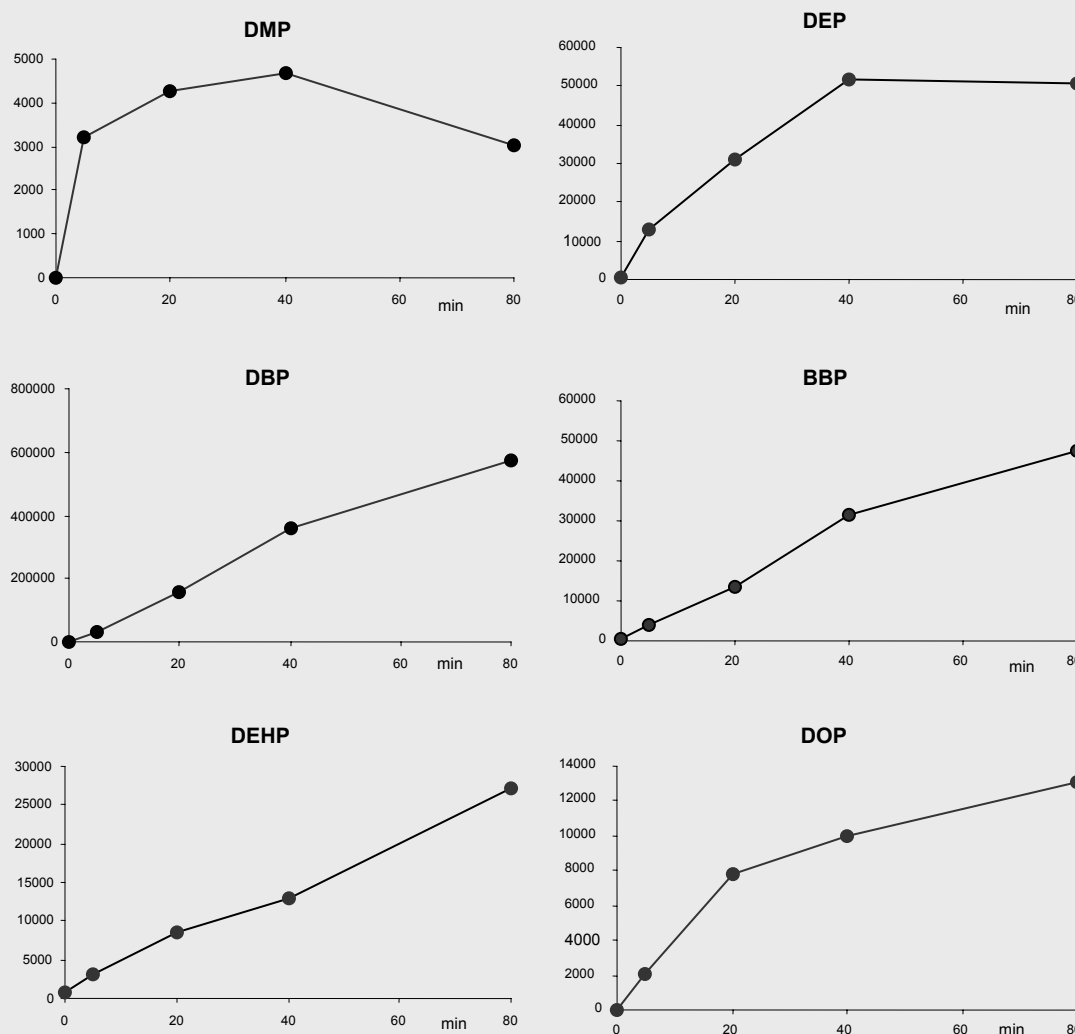
Para ello, se llevaron a cabo extracciones durante 0, 5 10, 20, 40 y 80 minutos, en las condiciones experimentales optimizadas (PDMS-DVB, 100°C, con agitación). Las curvas cinéticas obtenidas se muestran en la **Figura IV.2.2.2.3**.

Tal como se observa, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, en general, está directamente relacionado con el peso molecular de los ftalatos. Para DMP y DEP, las cinéticas de extracción son relativamente rápidas y el equilibrio se alcanza en aproximadamente 40 minutos. Después de 80 minutos de muestreo, se produce un descenso en la respuesta para el DMP.

Esta observación puede deberse a fenómenos de adsorción competitiva que podrían producir el desplazamiento de los analitos más volátiles de la superficie de la fibra<sup>23</sup>. Para el resto de los compuestos, el equilibrio no se alcanza incluso con 80 minutos de exposición (el tiempo máximo de extracción estudiado). Estos resultados confirman los obtenidos para el

efecto de la agitación, en los que se observó un efecto positivo significativo para todos los compuestos, lo que indicaba que no se habían alcanzado condiciones de equilibrio en el tiempo de extracción utilizado (20 minutos).

**Figura IV.2.2.2.3** Curvas cinéticas de la DSPME (PDMS-DVB, 100°C, con agitación) para los seis ftalatos estudiados (respuestas en cuentas de área).



Dado que es necesario establecer un compromiso entre el tiempo de análisis y la sensibilidad del método, se decidió mantener 20 minutos como tiempo de extracción. En este caso, tal como se deriva de las gráficas, nos encontramos bajo condiciones cinéticas para la todos los compuestos, por lo que el control del tiempo es un factor importante.

### IV.2.2.3 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO PROPUESTO

#### IV.2.2.3.1 Condiciones experimentales

Para el estudio de las características analíticas del método, se utilizaron las condiciones experimentales optimizadas y que se resumen en la **Tabla IV.2.2.3.1**.

**Tabla IV.2.2.3.1** Condiciones experimentales del método de SPME propuesto para la determinación de ftalatos en muestras de agua.

Parámetro	Valor
Fibra	PDMS-DVB
Temperatura	100°C
Modo de muestreo	DSPME
Volumen de muestra	10 mL
Volumen del vial	22 mL
Agitación	Si (magnética)
Adición de sal	0%
Tiempo de extracción	20 min

#### IV.2.2.3.2 Blancos de agua

Tal como se mencionó en el **apartado II.2.8**, uno de los problemas más importantes en el análisis de los ftalatos en muestras de agua, es el establecimiento de las muestras empleadas como blancos. La obtención de un agua libre de compuestos resulta imprescindible para evaluar el método en términos de límites de detección y rango lineal.

Los ftalatos se han detectado en todo tipo de aguas purificadas utilizadas comúnmente en el laboratorio, incluyendo agua destilada, incluso empleando destiladores de cristal, agua Milli-Q y aguas comerciales especiales para la determinación de VOCs<sup>10,24,25</sup>. De hecho, algunos autores determinaron las concentraciones de ftalatos que presentaba el agua purificada que utilizaron en sus estudios. Estos niveles fueron bastante altos (ver **Tabla II.2.2.1.1**), considerando las concentraciones a las que estos compuestos deben ser monitorizados en el medioambiente<sup>7,8,26,27</sup>.



En estos casos, las señales de los blancos deben ser consideradas en la estimación de los LODs, provocando que estos sean más altos, principalmente para DBP y DEHP, que son los ftalatos más ubicuos.

En este estudio, los blancos de SPME se llevaron a cabo, en un primer momento, con agua Milli-Q. En es tipo de agua se detectaron todos los ftalatos considerados, excepto el DOP, siendo el BBP y el DEHP los encontrados a mayor concentración.

Por este motivo, se decidió trabajar con un agua ultrapura comercial. En los análisis del agua seleccionada (ver **Apartado IV.2.1.1**), también se detectó la presencia de DEP, DBP y DEHP, los dos primeros a niveles muy bajos, y el DEHP, aunque a una concentración mayor, bastante más baja que la encontrada en el agua Milli-Q.

Las concentraciones estimadas de los compuestos encontrados se recogen en la **Tabla IV.2.2.3.2**.

**Tabla IV.2.2.3.2** *Concentraciones en (pg/mL) de los ftalatos encontrados en las muestras de agua usadas como blancos en este estudio.*

Tipo de agua	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DOP
Agua Milli-Q	178	215	229	32	911	-
Agua ultrapura comercial (J.T. Baker) (n=3)	-	5±1	14±4	-	524±30	-

La contaminación del agua ultrapura con DEHP se comprobó más tarde, mediante el análisis bajo las mismas condiciones de otras muestras de agua, en concreto agua mineral y agua de río, en las cuales los resultados encontrados para el DEHP fueron 2 veces más bajos.

Sin embargo para el DEP y el DBP, es difícil encontrar el origen de los niveles detectados, ya que pueden deberse tanto a contaminación presente en la propia agua ultrapura, como a contaminación introducida durante el procedimiento analítico.

Teniendo en cuenta estos resultados y al no disponer de un blanco de agua más adecuado, se decidió emplear el agua ultrapura comercial en la evaluación de la linealidad del método y en la estimación de los LODs.

#### IV.2.2.3.3 Linealidad

La linealidad del método se evaluó mediante la realización de un calibrado empleando disoluciones de agua ultrapura a distintos niveles de concentración. El rango de concentración estudiado para DMP, DEP, DBP, BBP y DOP fue desde los 80 pg/mL a los 8000 pg/mL y para el DEHP de 500 pg/mL a 8000 pg/mL. A las señales obtenidas para cada nivel, se les sustrajo la señal obtenida en los blancos, con el fin de considerar el nivel de fondo.

En la **Tabla IV.2.2.3.3** se recogen los intervalos de concentración para cada compuesto y los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) para el análisis de regresión de la respuesta correspondiente.

**Tabla IV.2.2.3.2** Intervalo de concentraciones y coeficientes de correlación obtenidos en el estudio de la linealidad del método.

Compuesto	Intervalo de concentración (pg/mL)	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )
DMP	81.80-8180	0.9989
DEP	82.40-8240	0.9991
DBP	80.76-8076	0.9990
BBP	79.12-7912	0.9985
DEHP	511.2-8180	0.9993
DOP	77.04-7704	0.9980

Los valores de  $R^2$  fueron iguales o superiores a 0.998 para todos los compuestos, demostrando que existe una relación directamente proporcional, en este caso lineal, entre la cantidad de analito extraída y la que existe inicialmente en la muestra para el rango de concentraciones estudiado.

#### IV.2.2.3.4 Precisión

La precisión del procedimiento experimental se evaluó a dos niveles de concentración calculando la desviación estándar relativa (RSD) de tres réplicas para cada nivel. En la **Tabla IV.2.2.3.4** se muestran los valores de RSD calculados que variaron entre 3.4 % para el DEP y 16 % para el DEHP, y entre 7.3 % para BBP y 12 % para el DEP.

**Tabla IV.2.2.3.4** *Precisión del método.*

Compuesto	Repetibilidad (RSD %, n=3)	
	500 pg/ml	2500 pg/mL
DMP	5.2	8.2
DEP	3.4	12
DBP	9.7	9.3
BBP	8.0	7.3
DEHP	16	6.0
DOP	11	11

**IV.2.2.3.5 Sensibilidad**

Como se introdujo en el apartado referente a los blancos de agua, para estimar los LODs de los ftalatos considerados en este estudio, se tuvieron en cuenta los niveles detectados en los blancos de agua ultrapura (ver **Tabla IV.2.2.3.2**). Así, los LODs para DEP y DBP se estimaron como la concentración correspondiente a la señal del blanco más tres veces su desviación estándar. En el caso del DEHP, debido a la contaminación presente en el agua ultrapura, y dado que se analizaron diferentes tipos de agua, incluyendo aguas de bebida y aguas superficiales, se decidió utilizar la muestra que proporcionó los resultados más bajos de DEHP para la estimación de su LOD.

Para el resto de los compuestos, al igual que anteriores estudios, los LODs se calcularon como la concentración correspondiente a una señal analítica tres veces superior al ruido de fondo.

En el cálculo de los LOQs se tuvieron en cuenta las mismas consideraciones, correspondiendo, en este caso, a la concentración de una señal analítica igual al blanco más diez veces su desviación estándar (DEP, DBP y DEHP) o una señal analítica diez veces superior al ruido de fondo (DMP, BBP y DOP). De este modo, en la **Tabla IV.2.2.3.5** se recogen los LODs y LOQs estimados para cada uno de los ftalatos.

**Tabla IV.2.2.3.5** *Límites de detección del método.*

Compuesto	LODs (pg/mL)	LOQs (pg/mL)
DMP	8	27
DEP	7	23
DBP	26	87
BBP	2	7
DEHP	103	343
DOP	16	53

Estos LODs estimados deben considerarse con precaución y deben comprobarse siempre analizando previamente un blanco y revisando la relación señal/ruido obtenida. Así, si los niveles de concentración detectados en el análisis de los blancos pudieran atribuirse a contaminación presente en la propia muestra y no a contaminación introducida por el procedimiento analítico, los LODs para DEP, DBP y DEHP serían considerablemente más bajos, probablemente inferiores a 2 pg/mL.

Por otra parte, si se introduce algún tratamiento adicional de la muestra antes de la extracción, también debe considerarse en la estimación de los LODs. Este es el caso del proceso de filtración que se aplica en el análisis de muestras complejas, por ejemplo, aguas residuales.

Para evaluar la posible contaminación introducida en este paso, se analizaron blancos de agua ultrapura antes y después de filtrarla a través de filtros de fibra de vidrio de 0.45 µm. Todo el material utilizado se trató siguiendo el protocolo de limpieza indicado en el **Apartado IV.3.1.2**. Se obtuvieron respuestas equivalentes en ambos casos, excepto para los compuestos DEP y DBP, por tanto sus LOD serán mayores (37 y 60 pg/mL, respectivamente) cuando se introduzca una etapa de filtración en el pretratamiento de la muestra.

#### IV.2.2.6 Análisis de muestras reales

Debido a su presencia en una inmensa variedad de productos y su entrada continua en los compartimentos medioambientales, los ftalatos se detectaron en todas las muestras examinadas. Las muestras analizadas incluyeron, agua mineral envasada, agua de mar de un puerto industrial, agua de río, aguas residuales correspondientes a los puntos de entrada y salida de una planta de tratamiento de aguas urbanas (EDAR), y a un colector del sistema de alcantarillado de la ciudad (Santiago de Compostela).

Dado que la muestra de influente de depuradora es la más compleja de todas, se decidió estudiar el posible efecto matriz con este tipo de muestra. Para este estudio, la muestra filtrada se analizó mediante el método propuesto, sin adición de los compuestos y con una adición al nivel de concentración de 2500 pg/mL. Las concentraciones de analito medidas por calibrado externo fueron equivalentes a las concentraciones adicionadas obteniendo recuperaciones entre 87 y 110%, con una desviación estándar relativa entre 3 y 10 %. Este estudio confirma que no existe un efecto significativo de la matriz en la respuesta y que por tanto, es posible la cuantificación de las muestras mediante calibrado externo.

En la **Tabla IV.2.2.6.1** se recogen las concentraciones encontradas para los seis ftalatos en las muestras analizadas.

**Tabla IV.2.2.6.1** *Concentración (en pg/mL) de los ftalatos encontrados en las muestras reales estudiadas, obtenidas por calibrado externo.*

Muestra	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DOP
Agua mineral	26	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
Agua de mar (puerto industrial)	<LOD	1606	<LOD	19	<LOD	<LOD
Agua de río	28	30	<LOQ	11	<LOD	<LOD
Efluente	<LOD	116	303	<LOD	859	<LOD
Influente	<LOD	2917	405	21	3280	<LOD
Colector urbano	<LOD	460	866	127	6172	270

LOD= limite de detección, LOQ= limite de cuantificación

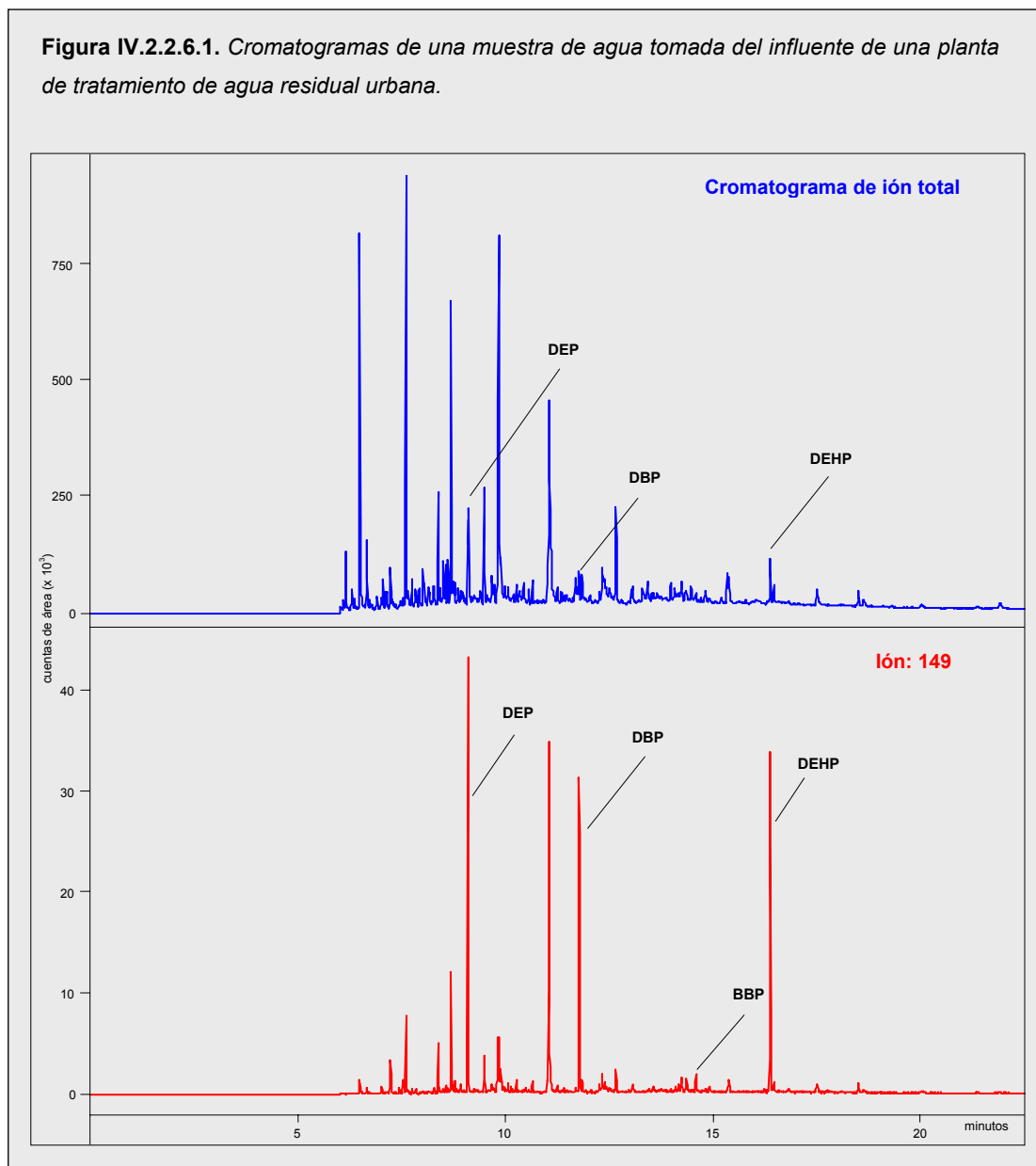
Como se indicó en el apartado anterior, las muestras de agua residual se filtraron y, por tanto, se tuvieron en cuenta los niveles encontrados en los blancos filtrados en la cuantificación.

El DEP, el DBP y el DEHP fueron los compuestos encontrados a concentraciones más altas, y de entre las muestras analizadas, las aguas residuales correspondientes al influente y al colector urbano fueron las más contaminadas. En esta última muestra también se detectó el DOP. Estos niveles de concentración tan altos, son perfectamente lógicos, ya que el DEHP es el plastificante más usado y el DEP y DBP son componentes bastante comunes de los productos farmacéuticos y de cuidado personal.

Por otra parte, al contrastar los resultados obtenidos para el influente y el efluente, se observa que las concentraciones de estos compuestos se reducen considerablemente, por lo que, como en el caso de las fragancias sintéticas, los procesos que ocurren durante el tratamiento de las aguas residuales, son importantes para conseguir su eliminación o la disminución de su entrada en los medios acuáticos.

En las muestras de aguas superficiales las concentraciones, en general, fueron más bajas. En la muestra de agua de mar, se encontró una concentración alta de DEP, sin embargo, las concentraciones para DBP y DEHP estuvieron por debajo de los LODs. El DMP sólo se detectó en las muestras de agua mineral y de agua de río a unos niveles de entre 25-30 pg/mL.

En la **Figura IV.2.2.6.1** se muestran los cromatogramas de ión total y para el ión 149 de la muestra de influente donde se comprueba que son detectables cuatro de los seis ftalatos estudiados.



En general, el método de DSPME desarrollado para la determinación de ftalatos en agua en este estudio presentó buena correlación en un rango lineal amplio, con LODs muy inferiores a los encontrados en estudios anteriores utilizando SPME (ver **Apartado II.2.2.1.3.3**), permitiendo su aplicación tanto al análisis de aguas potables como aguas residuales.

El artículo al que han dado lugar los resultados de este estudio se ha publicado en la revista **Journal of Chromatography A 1072 (2005) 63**, y se adjunta en el Anexo VI.2.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló. Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 2180.
- (2) M. Möder, P. Popp, J. Pawliszyn, J. Microcol. Sep. 10 (1997) 875.
- (3) T. Hyötyläinen, K. Grob, M. Biedermann, M.L. Riekkola, J. High Resol. Chromatogr. 20 (1997) 410.
- (4) H.R. Rogers. Sci. Total Environ. 185 (1996) 3.
- (5) European Union Commission. Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. Official Journal of the European Communities. L 331, 15-12-2001, pp 1-4.
- (6) Comisión de las Comunidades Europeas. Propuesta 2006/0129 (COD) de la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Bruselas, 17-7-2006.
- (7) World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality. 3rd edition (Draft). Chapter 8: Chemical Aspects. World Health Organization. 2003. pp 254.  
  
[http://www.who.int/docstore/water\\_sanitation\\_health/GDWQ/Updating/draftguidel/2003gdwq8.pdf](http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/GDWQ/Updating/draftguidel/2003gdwq8.pdf).
- (8) US Environmental Protection Agency (EPA). National primary drinking water regulations: maximum contaminant levels for organic contaminants. US Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations 40 CFR 141.61. 2002. pp. 426-428.
- (9) K. Luks-Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, J. Chromatogr. A 938 (2001) 93.
- (10) E. Cortazar, O. Zuloaga, J. Sanz, J.C. Raposo, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J. Chromatogr. A 978 (2002) 165.
- (11) E. Psillakis, N. Kalogeranis, J. Chromatogr. A 999 (2003) 145.
- (12) N. Casajuana, S. Lacorte, Chromatographia 57 (2003) 649.
- (13) L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 998 (2003) 41.
- (14) Varian, Inc. Saturn GC/MS Workstation. Version 5.4. Software Reference: Operator's

Manual. Varian Analytical Instruments. Walnut Creek, California. 1999.

(15) A. Peñalver, R. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 872 (2000) 191.

(16) A. Peñalver, R. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 922 (2001) 377.

(17) E. Pretsch, J.S. Seibl, W. Simon, T. Clerc. "Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos". Ed. Springer-Verlag, Barcelona (1998).

(18) Statgraphics-Plus, Diseño experimental, Apéndice C, Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA, 2003.

(19) J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley, New York, 1997.

(20) P. Barták, L. Cáp, J. Chromatogr. A. 767 (1997) 171.

(21) M. Polo, G. Gómez-Noya, J.B. Quintana, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, Anal. Chem. 76 (2004) 1054.

(22) P. Landin, M. Llompart, M. Lourido, C. García-Jares, R. Cela, J. AOAC Int. 86 (2003) 44.

(23) S.N. Semenov, J.A. Koziel, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 873 (2000) 39.

(24) K. Hashizume, J. Nanya, C. Toda, T. Yasui, H. Nagano, N. Kojima, Biol. Pharm. Bull. 25 (2002) 209.

(25) S. Jonsson, J. Ejlersson, A. Ledin, I. Mersiowsky, B.H. Svensson, Water Res. 37 (2003) 609.

(26) A.P. Wezel, P. van Vlaardinger, R. Posthumus, G.H. Crommentuijn, D.T.H.M. Sijm, Ecotoxicol. Environ. Saf. 46 (2000) 305.

(27) Danish Environmental Protection Agency, Guidelines on remediation of contaminated sites, Environmental Guidelines No. 7, 2002.

<http://www.mst.dk/udgiv/publications/2002/87-7972-280-6/pdf/87-7972-281-4.pdf>.



### IV.3 DETERMINACIÓN DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs) EN MUESTRAS DE AGUA

Dentro de la familia de los compuestos ignífugos bromados (BFRs), los PBDEs constituyen uno de los grupos de mayor consumo. Dentro de estos, los PBDEs de bajo grado de bromación, en especial los congéneres de tri a hexaBDEs, debido a su persistencia y lipofilia, pueden acumularse con facilidad en los distintos compartimentos medioambientales; y esta es la razón por la que se encuentran habitualmente en el análisis de muestras ambientales<sup>1</sup>. Por su parte, los PBBs, aunque ya no se producen<sup>2</sup>, se siguen detectando en muestras ambientales, por lo que su estudio resulta interesante sobre todo si tenemos en cuenta que presentan propiedades físico-químicas y toxicológicas similares a los PCBs.

La mayoría de los procedimientos para la determinación de estos compuestos en muestras ambientales se basan en la extracción de la muestra con disolventes, y un posterior tratamiento de purificación y concentración de los extractos obtenidos antes de su análisis<sup>3-9</sup>.

Teniendo como prioridad la búsqueda de alternativas más sensibles, sencillas y respetuosas con el medioambiente a los métodos ya desarrollados, el objetivo de esta parte de la Tesis dedicada a los BFRs, se centró, por una parte, en estudiar si la SPME sería una técnica adecuada para la extracción de los PBDEs y los PBBs, y por otra parte, en desarrollar un método de detección basado en la GC acoplada a espectrometría de masas en tandem (MS/MS), para obtener una mayor sensibilidad y selectividad en la determinación. Esta técnica ya se utilizó previamente con éxito en la determinación de PCBs y otros grupos de compuestos halogenados relacionados<sup>10-15</sup>.

Los resultados obtenidos en la optimización se desarrollan y discuten en los siguientes apartados.

### **IV.3 DETERMINACIÓN DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs) EN MUESTRAS DE AGUA**

<b>IV.3.1 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>205</b>
<i>IV.3.1.1 Patrones y muestras.....</i>	<i>205</i>
<i>IV.3.1.2 Procedimiento de microextracción en fase sólida.....</i>	<i>206</i>
<i>IV.3.1.3 Condiciones instrumentales de medida.....</i>	<i>207</i>
<b>IV.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>209</b>
<b><i>IV.3.2.1 Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas.....</i></b>	<b><i>209</i></b>
<b><i>IV.3.2.2 Optimización del proceso de microextracción.....</i></b>	<b><i>211</i></b>
<i>IV.3.2.2.1. DISEÑO FACTORIAL: Estudio de la influencia del recubrimiento polimérico, del modo de muestreo, de la agitación y del efecto salino.....</i>	<i>211</i>
<i>IV.3.2.2.2 Estudio del efecto de la temperatura de extracción y el volumen de las fases en la eficacia de la HSSPME de PBBs Y PBDEs.....</i>	<i>220</i>
<i>IV.3.2.2.3 Estudio del efecto memoria.....</i>	<i>223</i>
<i>IV.3.2.2.4 Estudio cinético de la HSSPME de PBBs Y PBDEs.....</i>	<i>224</i>
<b><i>IV.3.2.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO.....</i></b>	<b><i>225</i></b>
<i>IV.3.2.3.1 Estudio de la linealidad, LODs y repetibilidad del método.....</i>	<i>226</i>
<i>IV.3.2.3.2. Estudio de la recuperación. Aplicación a muestras reales.....</i>	<i>227</i>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>230</b>

### IV.3.1 PARTE EXPERIMENTAL

#### IV.3.1.1 Patrones y muestras

En este estudio se utilizó como patrón mezcla técnica de pentaBDE (“pentamix”) con una concentración total de 10 µg/ml suministrada por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). La composición de la “pentamix” se determinó experimentalmente, obteniendo las siguientes concentraciones para cada congénere: 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-47) 4.1 µg/mL, 2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE-99) 1.2 µg/mL, 2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE-100) 4.1 µg/mL, 2,2',3,4,4'-pentabromodifenil éter (BDE-85) 0.10 µg/mL, 2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE-153) 0.23 µg/mL, 2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE-154) 0.34 µg/mL.

También se utilizó un patrón de 4-bromodifenil éter (BDE-3) de 100 µg/mL en metanol (99.5%), suministrado por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania), y los patrones sólidos comerciales de 3,5-dibromo-1,1'-bifenilo (PBB-15, 97%) y 2,2',4,5'-tetrabromo-1,1'-bifenilo (PBB-49, 99.8 %), de Supelco (Bellefonte, PA). Por pesada, se prepararon disoluciones stock de los compuestos en isooctano con concentraciones de 840 µg/mL y 700 µg/mL, para el PBB-15 y el PBB-49, respectivamente.

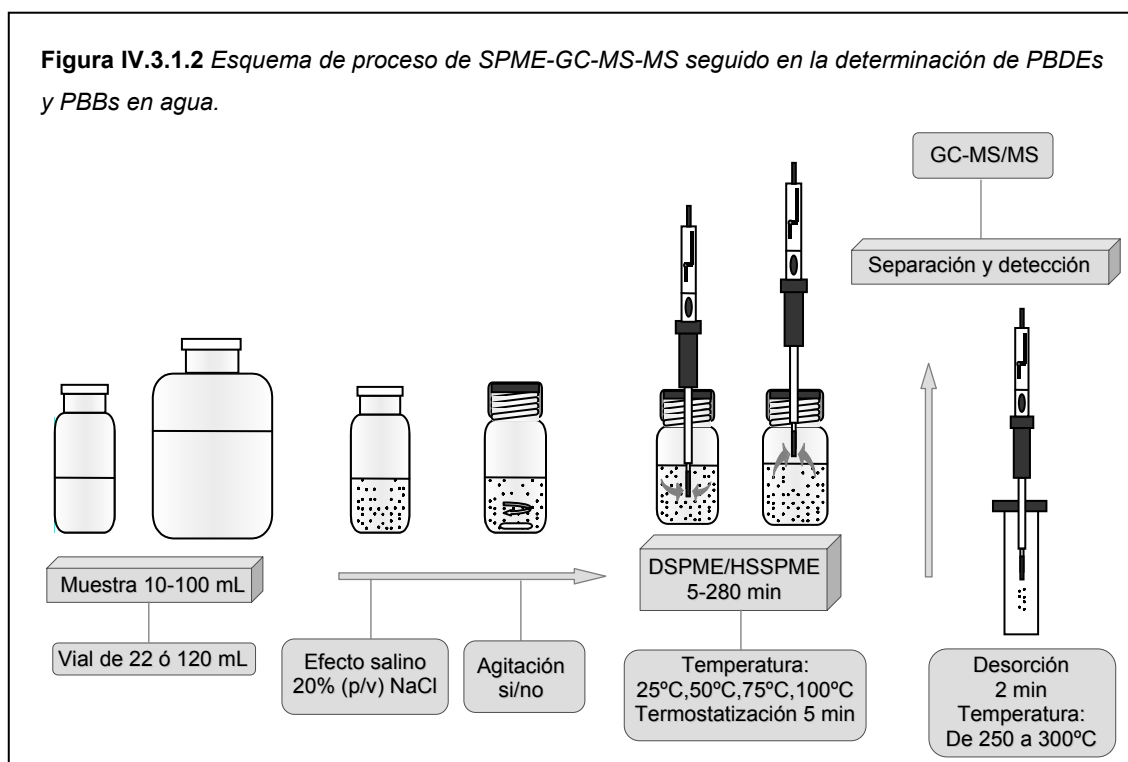
A partir de las disoluciones stock se prepararon disoluciones, tanto individuales como mezclas de los ocho congéneres de estudio, en diferentes concentraciones y disolventes según la finalidad del estudio a realizar. Los disolventes empleados, todos ellos de grado analítico, fueron: isooctano, acetona y acetato de etilo.

Además, en este estudio se emplearon muestras de agua con adición de los compuestos y sin adición, preparadas y conservadas según se indica en el **Apartado III.3**.

En el proceso de optimización del método y en el estudio de los parámetros analíticos de calidad, se emplearon disoluciones de agua Milli-Q, y en los estudios de aplicación del método, se analizaron muestras de agua de grifo tomadas en el propio laboratorio y muestras de agua residual tomadas en la entrada y la salida de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas, situada en las cercanías de Santiago de Compostela (correspondiente a 125000 habitantes).

### IV.3.1.2 Procedimiento de microextracción en fase sólida

La **Figura IV.3.1.2** muestra de modo esquemático, el procedimiento seguido en este trabajo para la extracción y concentración de los PBDEs y PBBs estudiados en las muestras de agua.



Alícuotas de muestras de agua de diferentes volúmenes se depositaron en viales de espacio de cabeza de 22 o 120 mL, dependiendo del experimento llevado a cabo. Los viales se sellaron con cápsulas de aluminio y septa recubiertos internamente de PTFE, y se sumergieron en un baño de agua a la temperatura indicada por el experimento (25, 50, 75 o 100°C). La muestra se mantuvo en el baño durante 5 min, antes de la extracción, para conseguir la termostatación de la misma. Después, se perforó el septum con una aguja, y se expuso la fibra en cuestión al espacio de cabeza o directamente a la muestra de 5 a 280 min, dependiendo del experimento. En las pruebas en las que fue necesaria la aplicación de agitación magnética, se introdujeron barras magnéticas en los viales y se mantuvo una agitación constante durante todo el proceso de extracción.

Los tipos de fibras considerados en este estudio fueron: poliacrilato (PA) de 85  $\mu\text{m}$ , polidimetilsiloxano (PDMS) de 100  $\mu\text{m}$ , Carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) de 75  $\mu\text{m}$ , polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) de 65  $\mu\text{m}$  y Carbowax-divinilbenceno (CW-DVB) de 65  $\mu\text{m}$ .

Una vez finalizado el periodo de exposición, la fibra se insertó inmediatamente en el inyector del cromatógrafo de gases, para llevar a cabo el análisis cromatográfico. La desorción se realizó durante 2 min, a 260°C para la fibra de CW-DVB, 270°C para PDMS-DVB, 300°C para PA y CAR-PDMS, y de 250 a 300°C para la fibra de PDMS.

#### IV.3.1.3 Condiciones instrumentales de medida

Para los análisis mediante GC-MS-MS, se empleó un cromatógrafo de gases modelo Varian® 3800, provisto de un inyector split/splitless, trabajando en el modo splitless y acoplado a un detector de espectrometría masas con trampa de iones modelo Varian® Saturn 2000, provisto de un modulo de MS-MS.

El control del equipo y el procesado de la señal se llevó a cabo con el programa informático Varian® Saturn GC-MS, versión 5.4<sup>16</sup>.

Para la obtención del espectro de masas de los compuestos, se empleó el modo de barrido completo (fullscan), escaneando el rango de masas de 40 a 650 m/z a una velocidad de 1 s/scan.

Para el análisis mediante MS-MS, el método constó de siete segmentos, un primer segmento de cinco minutos para el venteo del disolvente, y los siguientes segmentos para la determinación de cada uno de los compuestos de estudio, durante el cuál se produce una primera fragmentación (EI) por colisión con el chorro de electrones generado por el filamento y un posterior tratamiento de los iones generados.

Los parámetros generales empleados en este estudio se muestran en la **Tabla IV.3.1.3.1**.

Tabla IV.3.1.3.1. Condiciones instrumentales empleadas en el análisis de PBDEs y PBBs.

Varian® 3800 (GC)	
Columna	CPSil8 CB low-bleed MS (25mx0.25mmx0.25µm)
Gas portador	He (99.99%)
Tipo de inyector	Split/splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	2 min
Tª del inyector	de 250°C a 300°C según el tipo de fibra
Presión en cabeza de columna	10.4 psi a 60°C
Flujo de split	50 mL/min
Flujo en columna (He)	1.2 mL/min (constante)
Tª de la línea de transferencia	280°C
Programa de Temperaturas	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Primer Gradiente</li> </ul>	
Tª inicial	60°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de temperatura	30°C/min
Tª final	250°C
<ul style="list-style-type: none"> <li>Segundo Gradiente</li> </ul>	
Tª inicial	250°C
Rampa de temperatura	5°C/min
Tª final	280°C
Tiempo final	8 min
Tiempo total del análisis	32.3 min
Varian® Saturn 2000 (MSD)	
Modo de ionización	El (ionización electrónica), 70 eV
Velocidad de escaneo	0.60 s/scan
Sobrevoltaje del multiplicador	+100 V
Voltaje de modulación axial	4 V
Tª de la trampa de iones	250°C
Tª del manifold	50°C
Corriente de emisión del filamento	85 µA
AGC target	2000 cuentas
Tipo de CID (Disociación Inducida por colisiones)	Resonante

Los parámetros específicos del método de preparación de iones (IPM) para cada compuesto se recogen en la **Tabla IV.3.1.3.2**.

Tabla IV.3.1.3.2. Parámetros instrumentales específicos para cada compuesto del método de preparación de iones del método de MS-MS.

COMPUESTO	tr	Tiempo Inicio (min)	Rango (m/z)	Ión Padre (m/z)	Iones Cuantificación	Ventana de aislamiento (m/z)	Umbral de almacenamiento (m/z)	Amplitud de excitación
BDE-3	8.13	5	130-260	249	141+220	3	80	1
PBB-15	9.51	8.7	140-315	312	152	5	100	2.6
PBB-49	11.44	10.5	375-480	470	389+391	9	220	1.9
BDE-47	12.73	11.70	300-500	486	324+326+328	9	230	2
BDE-100	14.48	13.5	390-580	566	404+406	11	290	1.8
BDE-99	15.16							
BDE-85	16.55							
BDE-154	17.17							
BDE-153	18.66	16.70	460-650	644	482+484+486	11	340	1.85

### IV.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### IV.3.2.1 Identificación de los compuestos y optimización de las condiciones cromatográficas

En primer lugar, para la identificación de los compuestos estudiados, se realizó la inyección de patrones individuales de BDE-3, de PBB-15, de PBB-49 y de la mezcla técnica “pentamix” en el GC-MS, de forma que los analitos se identificaron por su espectro de masas característico y su tiempo de retención.

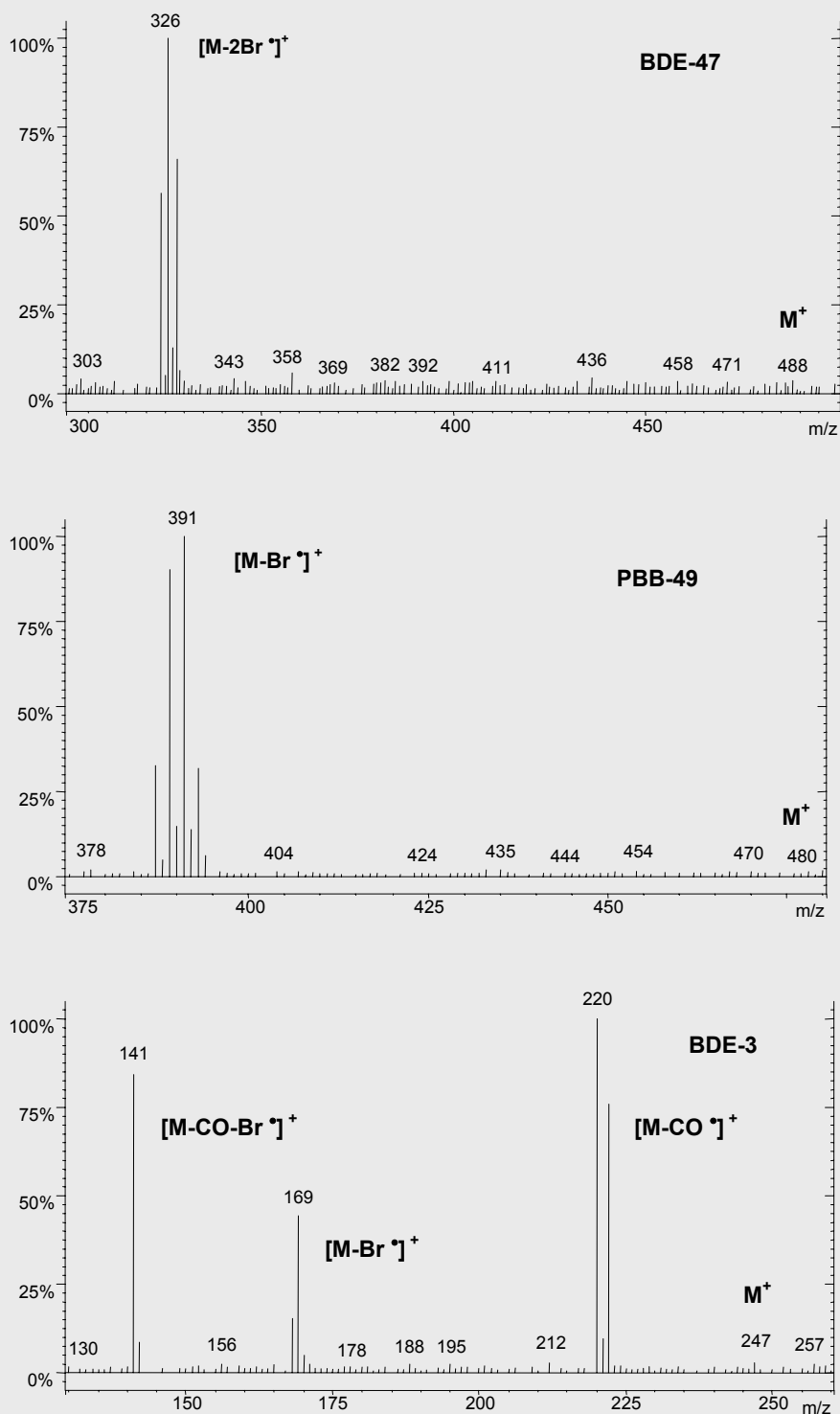
La composición de la mezcla “pentamix” se determinó experimentalmente calculando la proporción relativa de cada pico, obteniendo los siguientes porcentajes para cada congénere: BDE-47, 41%; BDE-99, 41%; BDE-100, 12%; BDE-85, 1%; BDE-153, 3.4% y BDE-154, 2.3%. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio de Sjödin et al.<sup>17</sup>

Para la optimización de las condiciones cromatográficas de separación, se realizaron una serie de pruebas mediante la inyección directa de un patrón mezcla en ciclohexano conteniendo una concentración de 0.1 mg/L de “pentamix”, 1 mg/L de BDE-3 y 0.02 mg/L de PBB-15 y PBB-49. Se probaron distintos gradientes de temperatura para lograr una separación cromatográfica buena, y acortar en lo posible el tiempo de análisis. Además, se estudió el efecto de aumentar el tiempo de *splitless* en la respuesta, entre un rango de 0.2 y 2 min. Se comprobó que la respuesta aumentaba con el tiempo de *splitless* entre 0.2 y 1 min, lo que confirma que los compuestos no se descomponen ni se adsorben en el *liner* durante este tiempo. Se llegó así al programa de temperaturas recogido en la **Tabla IV.4.1.3.1**.

El tiempo de retención fue un parámetro muy reproducible y constante bajo estas condiciones (ver **Tabla IV.4.1.3.2**).

Por otra parte, de los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, se seleccionaron los iones precursores para cada grupo de PBDEs y para los PBBs, utilizados en el desarrollo del método de MS-MS (ver **Tabla IV.4.1.3.2**). Éstos se caracterizaron por presentar un pico base, correspondiente al ión molecular, y la aparición de iones de fragmentación debidos a la pérdida de átomos de bromo.

Los parámetros del método de MS-MS, se optimizaron mediante la utilización de la herramienta AMD (*Automated Method Development*), disponible en el software del equipo. Dicha optimización consiste en el estudio de la fragmentación de los compuestos, bajo distintos valores de amplitud de excitación.

**Figura 3.2.1.1** Patrones de fragmentación de los compuestos BDE-47, PBB-49 y BDE-3.



Para ello se aisló, en cada caso, el *cluster* del ión molecular en la trampa de iones, ajustando la ventana de aislamiento; y, a continuación, se excitó en modo resonante, con el mismo número de frecuencias que la ventana de aislamiento, para obtener la máxima sensibilidad, pero manteniendo el patrón de fragmentación característico de estos compuestos bromados. La optimización de los parámetros de disociación inducida por colisión (CID, *Collision Induced Dissociation*), se realizó de forma que se obtuviera una abundancia relativa del ión precursor entre un 5 y un 10%.

Como se puede apreciar en la **Figura 3.2.1.1**, el patrón de fragmentación mayoritario es el correspondiente a la pérdida de dos átomos de bromo,  $[M-2Br\bullet]^+$  (para PBB-15, BDE-47, BDE-100, BDE-99, BDE-153 y BDE-154), de manera similar al comportamiento encontrado previamente para la familia de los PCBs<sup>13</sup>. Sin embargo, para el PBB-49 (un tetrabromobifenilo) el patrón principal es la pérdida de un átomo de bromo,  $[M-Br\bullet]^+$ , y el BDE-3 (un monobromo difenil éter), además de la pérdida de un bromo,  $[M-Br\bullet]^+$ , presenta dos iones intensos correspondientes a  $[M-CO\bullet]^+$  y  $[M-COBr\bullet]^+$ , en un modo que recuerda al patrón de disociación de PCDDs y PCDFs<sup>14</sup>.

Una vez optimizado el método de detección se llevaron a cabo las primeras pruebas de microextracción con el fin de comprobar la viabilidad de esta técnica en la extracción de los PBDEs y PBBs seleccionados. Para ello se realizaron extracciones de muestras de agua Milli-Q adicionadas con diferentes concentraciones (del orden de pg/mL) de “pentamix”, mediante DSPME y HSSPME utilizando la fibra de PDMS. Los resultados obtenidos confirmaron la aplicabilidad de la SPME en la determinación de PBDEs y PBBs, además de apuntar la posibilidad de obtener unos límites de detección bajos.

#### IV.3.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROEXTRACCIÓN

##### IV.3.2.2.1. DISEÑO FACTORIAL: Estudio de la influencia del recubrimiento polimérico, del modo de muestreo, de la agitación y del efecto salino.

Siguiendo la estrategia de optimización multivariada propuesta en los estudios anteriores, se abordó el estudio de la SPME de los PBBs y PBDEs, en base a la aplicación de un diseño de experimentos. Los diseños experimentales son realmente útiles al proporcionar una matriz de experiencias a partir de la cual pueden estudiarse simultáneamente distintos parámetros que afectan al proceso de extracción, e incluso la interacción entre ellos, minimizando el número de ensayos.

Sin embargo, esta optimización simultánea de factores, presenta una limitación en cuanto al número de niveles al que se puede estudiar una variable no continua, como es el caso del tipo de recubrimiento de fibra; de modo que, si se incluyeran todas las fibras disponibles comercialmente en el diseño, el número de experiencias a realizar sería muy elevado. Por ello, al igual que el estudio de las fragancias sintéticas, se realizó un estudio del tipo de recubrimiento, previo al diseño factorial, para seleccionar las dos fibras más eficientes en la extracción de los PBBs y PBDEs.

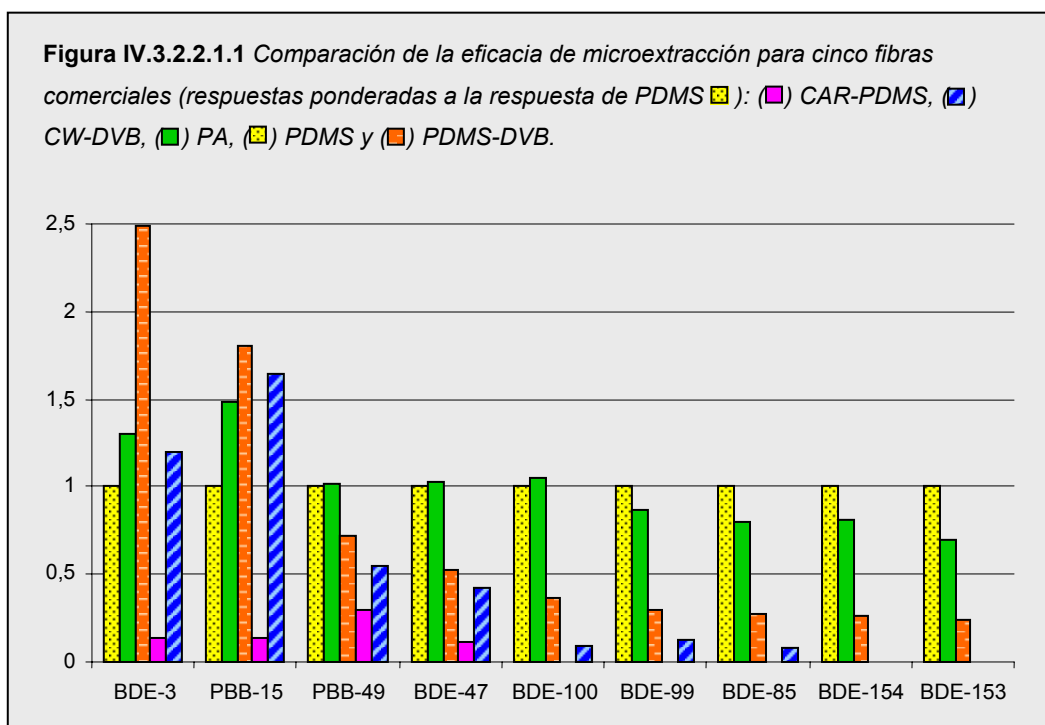
Para ello, se llevaron a cabo extracciones de estándares acuosos a un nivel de concentración de 50 pg/mL de PBBs (PBB-15 y PBB-49) y 100 pg/mL totales de “pentamix”, por duplicado, con cada una de las siguientes fibras: PDMS (100 µm), PDMS-DVB (65 µm), PA (85 µm), CAR-PDMS (75 µm) y CW-DVB (65 µm). Para estudiar únicamente el efecto del recubrimiento polimérico en la extracción, deben mantenerse constantes los parámetros restantes que afecten al proceso de extracción, para garantizar la reproducibilidad en las experiencias y que la variación sea debida esencialmente a la diferente respuesta obtenida con cada fibra.

Las muestras (10 mL) se extrajeron en el modo de espacio de cabeza a 100°C durante 30 minutos. Tras la extracción, éstas se desorbieron en el inyector del cromatógrafo, a la temperatura máxima de trabajo recomendada por el fabricante para cada una de ellas, de esta forma evitamos que los compuestos de alto peso molecular puedan quedar retenidos en la fibra y se eliminen completamente.

En la **Figura IV.4.2.2.1.1** se muestran los resultados obtenidos en este estudio, con las respuestas para cada fibra ponderadas a la respuesta obtenida con la fibra de PDMS.

En general, las respuestas obtenidas para la fibra CAR-PDMS fueron muy bajas para todos los compuestos. Para el BDE-3 y para el PBB-15, que son los compuestos de menor peso molecular, la fibra de PDMS-DVB es la que resulta más adecuada, aunque también presentan una buena eficacia las fibras de PDMS, PA y CW-DVB. A medida que aumenta el grado de bromación, del PBB-49 (con cuatro átomos de bromo) al BDE-153 (con seis átomos de bromo) la eficacia de extracción para las fibras PDMS y PA va aumentando respecto a las otras tres fibras. Este comportamiento resulta peculiar, teniendo en cuenta la distinta naturaleza, en cuanto a su polaridad, de ambas fibras, ya que su espesor y su volumen de fase son similares.

La fibra de PDMS es una fase apolar, útil en la extracción de compuestos apolares o poco polares, como son los compuestos aromáticos polibromados, mientras que la de PA es una fase relativamente polar. Sin embargo, otros autores también han obtenido buenos resultados en la extracción de compuestos poco polares, como los PAHs y el decaclorobifenilo, usando la fibra de PA<sup>18-20</sup>.



En cualquier caso, la eficacia obtenida con estas dos fibras de recubrimiento homogéneo, es superior a la obtenida con las fibras restantes, que presentan recubrimientos poliméricos con partículas porosas. Este hecho podría estar relacionado con una mejor difusión de los compuestos, de gran tamaño molecular, a través de un polímero homogéneo, mientras que la existencia de partículas porosas resulta más conveniente para la extracción de moléculas más pequeñas como es el caso del BDE-3 y el PBB-49.

Teniendo en cuenta lo mencionado, se decidió seleccionar estas dos fibras (PDMS y PA) para el diseño experimental. Además del tipo de fibra, se estudiaron el modo de muestreo (directo, DSPME, y en espacio de cabeza, HSSPME), la agitación de la muestra durante la extracción, y la adición de sal (0 y 20% p/v de cloruro sódico).

Se seleccionó un diseño factorial completo  $2^4$  de resolución V, el cual permite disponer de cinco grados de libertad para evaluar el error. El diseño propuesto generó la matriz de experiencias que se recoge en la **Tabla IV.3.2.2.1.1**.

Para la realización de los experimentos, se utilizaron alícuotas de muestra de 10 mL con un nivel de concentración del orden de los pg/mL, muestreadas en viales de 22 mL a una temperatura de 100°C, durante 30 minutos.

La temperatura y el tiempo de extracción se seleccionaron teniendo en cuenta las siguientes consideraciones. El tiempo de extracción se fijó en función de la duración del programa cromatográfico, permitiendo obtener una buena sensibilidad para todos los compuestos; mientras que la temperatura se seleccionó basándose en trabajos previos de

aplicación de la SPME en la determinación de compuestos como los PCBs. Para estos compuestos, alcanzar condiciones de equilibrio a temperatura ambiente requiere la extracción durante varias horas o incluso días; sin embargo, cuando se trabaja bajo condiciones cinéticas, las respuestas obtenidas a 100°C son considerablemente mayores que las obtenidas a 25°C. Los PBBs y PBDEs son compuestos de mayor peso molecular que los correspondientes PCBs con el mismo número de sustituyentes, ya que el peso atómico del bromo es mayor que el del cloro; por tanto, es de esperar que el efecto de la temperatura sea, si cabe, más importante.

En cuanto al paso de desorción, considerando que la mayoría de los compuestos objeto de estudio son moléculas pesadas, con puntos de ebullición altos, las fibras se desorbieron durante 2 min a la temperatura máxima de trabajo recomendada por el fabricante, esto es, 280°C para PDMS y 300°C para PA.

**Tabla IV.3.2.2.1.1.** *Matriz de experiencias del diseño factorial completo 2<sup>4</sup> generada por Statgraphics® Plus.*

Experiencia	Fibra	Modo de muestreo	Agitación	Adición de sal (%)
1	PDMS	DSPME	no	0
2	PA	DSPME	no	0
3	PDMS	HSSPME	no	0
4	PA	HSSPME	no	0
5	PDMS	DSPME	si	0
6	PA	DSPME	si	0
7	PDMS	HSSPME	si	0
8	PA	HSSPME	si	0
9	PDMS	DSPME	no	20
10	PA	DSPME	no	20
11	PDMS	HSSPME	no	20
12	PA	HSSPME	no	20
13	PDMS	DSPME	si	20
14	PA	DSPME	si	20
15	PDMS	HSSPME	si	20
16	PA	HSSPME	si	20

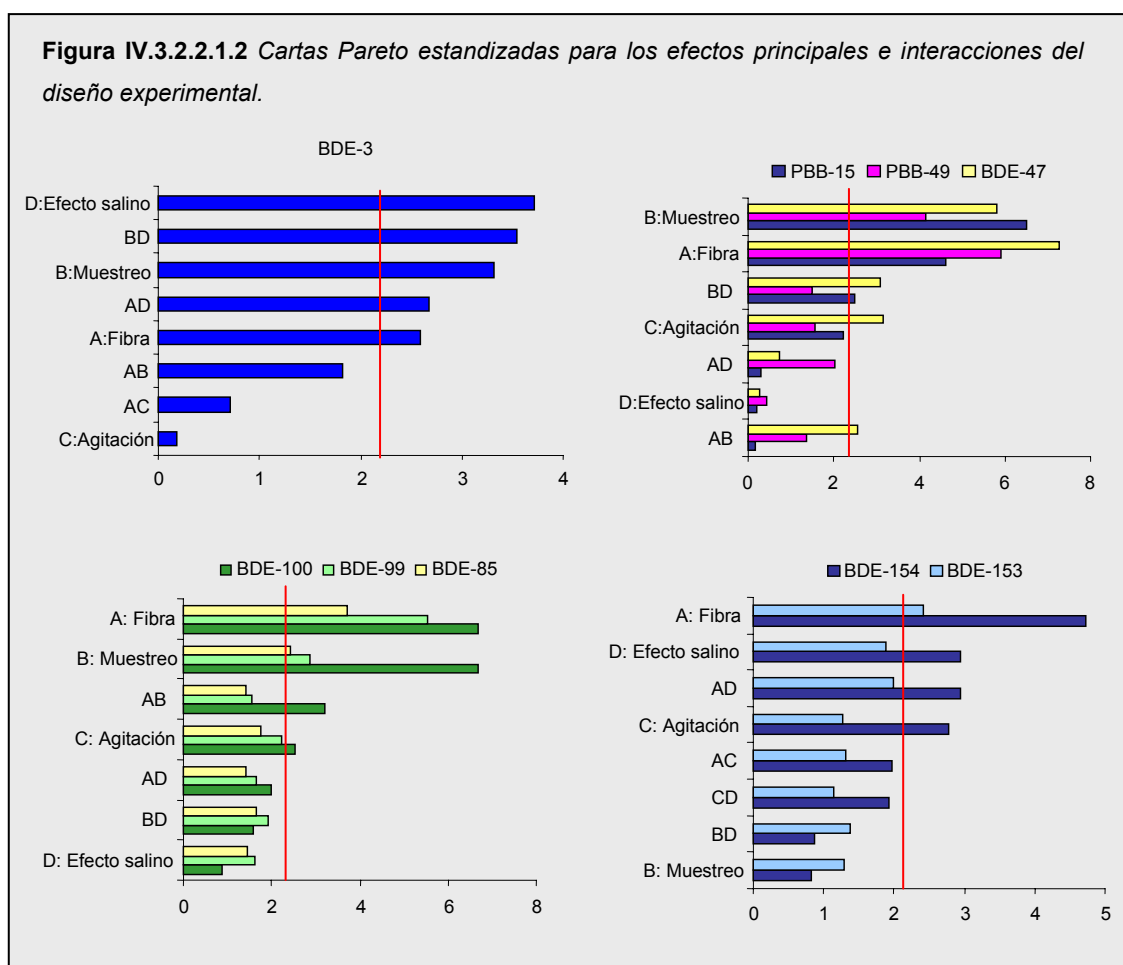
Una vez realizadas las 16 experiencias, se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados (respuesta analítica para cada compuesto en cuentas de área).

En la **Figura IV.3.2.2.1.2** se muestran las cartas Pareto estandarizadas obtenidas tras este análisis.

Las cartas Pareto estandarizadas son similares a un histograma horizontal del efecto estimado para cada factor e interacciones. La longitud de cada barra del gráfico es proporcional al valor absoluto del efecto estandarizado (se obtiene dividiendo el efecto estimado de cada factor o interacción entre su error estándar); así, cuanto mayor es la longitud de la barra, mayor es la influencia que el factor, o la interacción, origina sobre la respuesta.

La línea vertical marca el límite de significación (establecido para un nivel de confianza del 95 %), de modo que los factores y combinación de factores que superen esta línea, son significativos al nivel de confianza con que se trabaje.

Para simplificar su interpretación, los resultados para los congéneres se han agrupado en cuatro gráficos, según los distintos patrones de comportamiento encontrados, de forma que podemos visualizar de manera rápida y sencilla los efectos más significativos en el proceso de microextracción para cada uno de ellos.



De las cartas Pareto podemos extraer la siguiente información general, sobre el efecto de los factores estudiados.

La fibra es el factor que presenta el efecto más importante para la mayoría de los compuestos, superando el nivel de significación para todos ellos. El modo de muestreo presenta también un efecto significativo para la mayoría de los compuestos.

En cuanto a los dos factores restantes, se puede comprobar como la agitación presenta un efecto significativo o próximo a la significación para la mayoría de los compuestos, excepto para el BDE-3. Para este compuesto la adición de sal presentó los efectos de mayor importancia; sin embargo, para el resto de los compuestos fue un factor poco importante, no llegando al nivel de significación en ningún caso.

Las cartas Pareto permiten, además, evaluar los efectos de las interacciones entre factores. La interacción entre el factor fibra y el modo de muestreo (AB), es significativa para el BDE-47 y el BDE-100, para los cuales ambos factores son también significativos. Otra de las interacciones del factor fibra, en este caso con la adición de sal (AD), es significativa para el BDE-3 y BDE-154, para los cuales, el efecto de la sal resultó relevante en la extracción. Por último, en cuanto a la interacción entre el modo de muestreo y la adición de sal (BD), presentó un efecto significativo para el BDE-3 y BDE-47. Las demás interacciones no fueron significativas.

Para completar la información extraída de las cartas Pareto, es necesario recurrir a las gráficas de efectos principales y a las gráficas de interacciones, las cuales permiten establecer de qué modo afectan los factores e interacciones a la respuesta y como interactúan entre ellos.

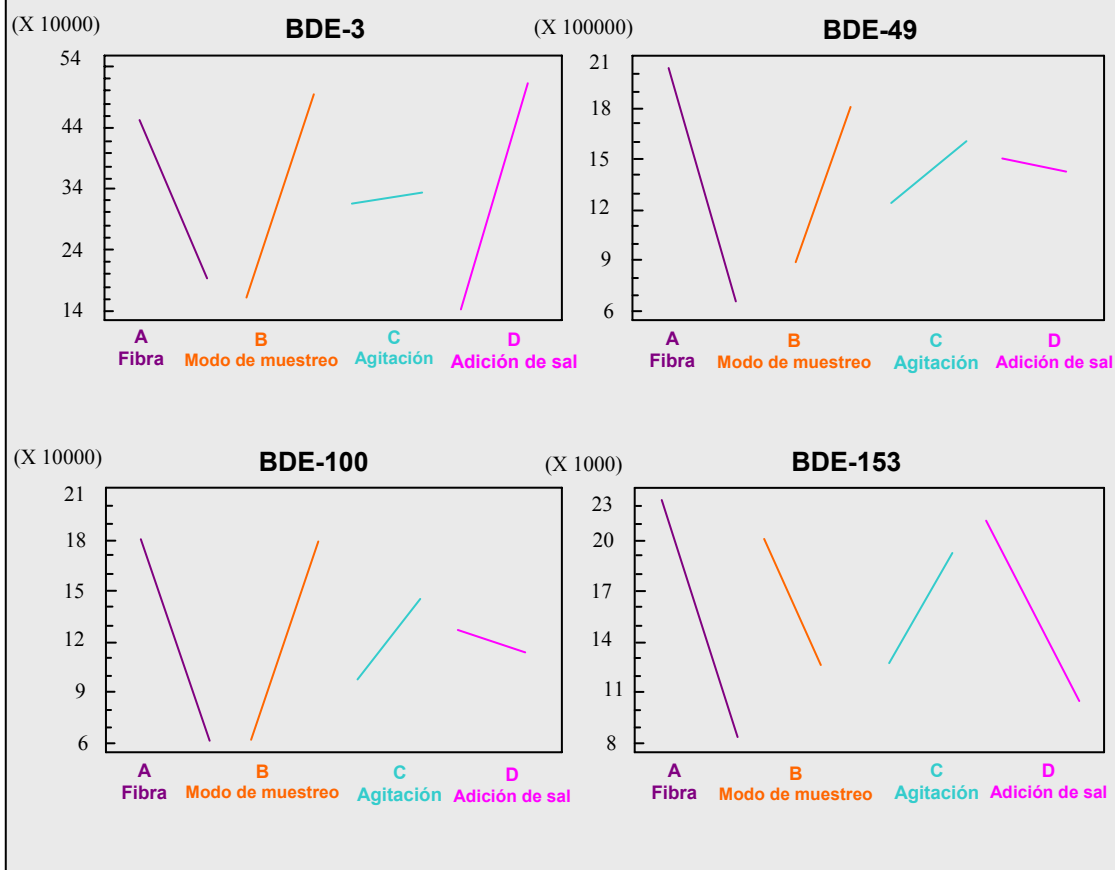
La **Figura IV.3.2.2.1.3** recoge las gráficas de efectos principales para algunos congéneres seleccionados, cada uno representativo del comportamiento de los grupos observados en las cartas Pareto.

Teniendo en cuenta la longitud de las líneas, comprobamos como la fibra y el modo de muestro presentan un efecto importante en la extracción de todos los congéneres estudiados, como ya se había observado en el análisis de las cartas Pareto.

La información relevante se obtiene no sólo de la longitud de las líneas sino también de la pendiente de las mismas. Así, el factor fibra presenta una pendiente negativa, lo que significa que se obtiene una extracción más eficaz con la fibra a la que se le había asignado el nivel bajo, es decir con la fibra de PDMS. El modo de muestreo, sin embargo, presenta una pendiente positiva, por lo que, se mejora el resultado de la extracción si se muestrea el espacio de cabeza en lugar de realizar el muestreo directo.

La única excepción son los congéneres hexabromados (BDE-153 y BDE-154), para los cuales la eficacia de extracción mejora en inmersión, aunque hay que indicar que este factor no presentó un efecto significativo sobre la extracción de estos compuestos (ver **Figura IV.3.2.2.1.2**).

**Figura IV.3.2.2.1.3** Gráficas de efectos principales para los compuestos BDE-3, PBB-49, BDE-100 y BDE-153 (respuestas expresadas como cuentas de área).



El hecho de obtener una mayor eficacia de extracción mediante el muestreo del espacio de cabeza puede resultar extraño si tenemos en cuenta que los compuestos considerados presentan un alto peso molecular combinado con bajas presiones de vapor y constantes de Henry<sup>21</sup>, sin embargo, se han publicado resultados similares para otros compuestos halogenados, como los PCBs<sup>10,22</sup>.

En principio, es de suponer que, debido al elevado peso molecular de los compuestos y considerando el tiempo de extracción seleccionado, nos encontramos bajo condiciones cinéticas. En este caso, el trabajar a temperatura elevada (100°C) puede provocar una aceleración en las cinéticas de extracción siendo especialmente importante para HSSPME.

El trabajar en HSSPME presenta múltiples ventajas, no sólo mejora la respuesta de los compuestos, sino que evita las interferencias de sustancias no volátiles de la matriz de la muestra y prolonga la vida útil de la fibra.

Respecto a la agitación, factor cuyo efecto estaba muy cerca del nivel de significación para la mayoría de los compuestos (ver **Figura IV.3.2.2.1.2**), se observa cómo sus líneas correspondientes tienen pendiente positiva, por lo que, la microextracción se favorece mediante la agitación de las muestras. Por el contrario, la adición de sal presenta efectos contrapuestos para los dos compuestos sobre los que tiene un efecto significativo, BDE-3 y BDE-153. El efecto salino favorece la extracción del BDE-3, pero disminuye la eficacia de extracción para el BDE-153, y en general, para el resto de los compuestos.

La adición de sal puede cambiar los coeficientes de actividad de los analitos en la matriz de la muestra y, en este sentido, mejora la extracción. Aunque, por otra parte, el aumento de la densidad y la viscosidad en la fase acuosa podría afectar negativamente a la cinética del proceso y, por tanto, a la eficacia.

Mediante las cartas Pareto se pudo comprobar que algunas interacciones también presentaban un efecto significativo sobre la extracción los PBBs y PBDEs.

Las interacciones pueden visualizarse en dos tipos de representaciones, en las gráficas de interacciones o en las gráficas de superficie de respuesta.

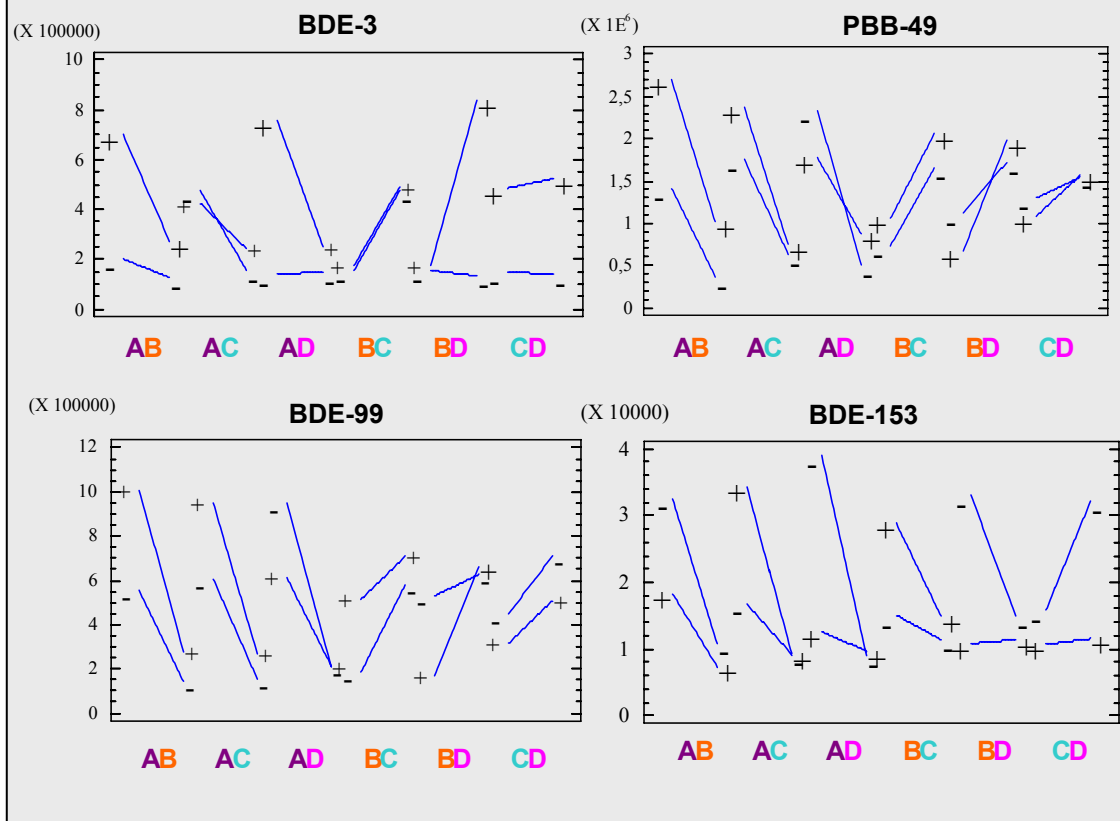
En la **Figura IV.3.2.2.1.4** se muestran las gráficas de interacción para los compuestos BDE-3, PBB-49, BDE-99 y BDE-152.

En las gráficas de interacción las líneas que se cruzan o las de distinta inclinación (no paralelas), muestran evidencia de la presencia de un efecto de interacción entre dos factores. Así, confirmando los resultados de las cartas Pareto, se observa que existe una clara interacción entre el modo de muestreo y la adición de sal (BD) para el BDE-3. Para este compuesto el efecto salino produce un importante incremento de la respuesta cuando se trabaja en espacio de cabeza, mientras que no influye en el modo directo. Para los siguientes compuestos en la serie de bromación (del PBB-15 al BDE-99), las líneas que definen esta interacción indican que la adición de sal presenta un efecto negativo para el muestreo directo y ligeramente positivo para HSSPME. Por último, para los compuestos más pesados, los hexaBDEs, se muestra un efecto negativo de la adición de sal, para ambos modos de extracción.

Desde el punto de vista termodinámico, el efecto de la sal debería ser independiente de los demás factores estudiados, aunque como ya se ha comentado, podrían ser aspectos cinéticos los responsables de estos efectos de interacción. En este sentido, parece razonable pensar que la adición de sal provoque un efecto negativo más importante sobre la cinética de extracción en modo directo, que en espacio de cabeza.



**Figura IV.3.2.2.1.4** Gráficas de interacciones para los compuestos BDE-3, PBB-49, BDE-99 y BDE-153 (respuestas expresadas como cuentas de área).



La interacción entre la fibra y la adición de sal (AD), también mostró un efecto significativo sobre el BDE-3 y próximo a la significación para la mayoría de los compuestos (ver **Figura IV.3.2.2.1.2**). Para el BDE-3 la adición de sal mejora notablemente la extracción con PDMS (el nivel bajo del factor fibra). Para el resto de los congéneres, el efecto, aunque menor, es justo el contrario, la adición de sal tiene efecto negativo en la extracción con PDMS, es decir, la respuesta obtenida con esa fibra es más alta cuando no se añade sal a la muestra. Para la fibra de PA (el nivel alto), la adición de sal es menos importante, pero para algunos compuestos tiene un efecto positivo, aunque no llega al nivel de significación.

La interacción entre la fibra y el modo de muestreo (AB) es significativa sólo para dos analitos, pero incluso para estos analitos las líneas del gráfico de interacción no se cruzan. Para ambas fibras, se obtiene una mejor respuesta en el HSSPME, excepto para el BDE-153, para el que el muestreo directo es más eficiente.

Para concluir el estudio de las interacciones, se evaluaron las superficies de respuesta obtenidas considerando dos factores, llegando, para la mayoría, a las mismas conclusiones discutidas ya con los gráficos de interacción.

Tras éste análisis de los resultados del diseño, se pueden extraer las condiciones óptimas para la extracción de cada uno de los compuestos, tal como se resumen en la **Tabla IV.3.2.2.1.2**, indicándose en cursiva los factores que han resultado significativos en cada caso.

**Tabla IV.3.2.2.1.2.** Condiciones óptimas para la extracción de PBDES y PBBs.

	A: Fibra	B : Modo de muestreo	C : Agitación	D: Adición de sal
<b>BDE-3</b>	<i>PDMS</i>	<i>HSSPME</i>	No	20 %
<b>PBB-15</b>	<i>PDMS</i>	<i>HSSPME</i>	Si	20 %
<b>PBB-49</b>	<i>PDMS</i>	<i>HSSPME</i>	Si	0%
<b>BDE-47</b>	<i>PDMS</i>	<i>HSSPME</i>	<i>Si</i>	20%
<b>BDE-100</b>	<i>PDMS</i>	<i>HSSPME</i>	<i>Si</i>	0 %
<b>BDE-99</b>	<i>PDMS</i>	<i>HSSPME</i>	Si	0 %
<b>BDE-85</b>	<i>PDMS</i>	<i>HSSPME</i>	Si	0 %
<b>BDE-153</b>	<i>PDMS</i>	<i>DSPME</i>	Si	0 %
<b>BDE-154</b>	<i>PDMS</i>	<i>HSSPME</i>	Si	0 %
<b>Condiciones de trabajo seleccionadas</b>	PDMS	HSSPME	Si	0 %

En general, puede apreciarse cómo las condiciones óptimas son similares para la mayoría de los congéneres. Para todos ellos se obtiene una extracción eficaz con la fibra PDMS mediante HSSPME (con excepción del BDE-153) y con agitación de la muestra. En cuanto a la adición de sal, se ha optado por no emplearla, teniendo en cuenta que sólo presenta un efecto claramente positivo para el BDE-3 (ver **Figura IV.3.2.2.1.3**).

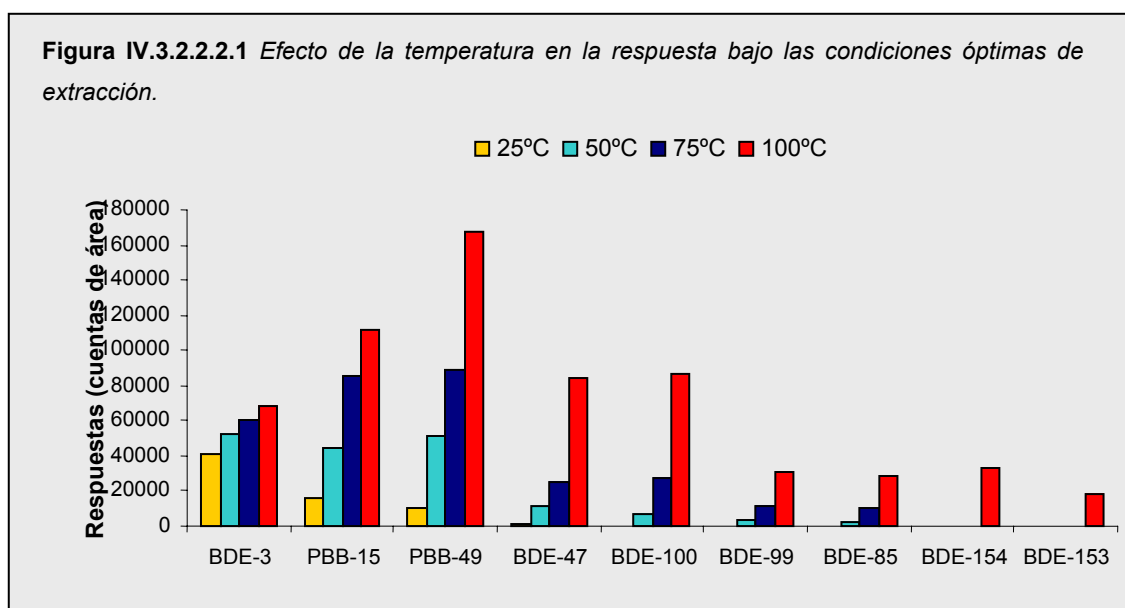
#### IV.3.2.2.2 Estudio del efecto de la temperatura de extracción y el volumen de las fases en la eficacia de la HSSPME de PBBs Y PBDEs

La temperatura a la que se realiza la extracción es un parámetro importante en el proceso de microextracción, sobre todo, para especies semivolátiles como las estudiadas (PBBs y PBDEs).

Hasta el momento todas las experiencias, incluido el diseño, se realizaron a una temperatura de 100°C; sin embargo, es necesario confirmar que esta temperatura es la más adecuada para la extracción de los analitos de interés.

Para estudiar el efecto de la temperatura de extracción, se analizaron diferentes alícuotas (10 mL) de muestra con adición de los compuestos a nivel de concentración de pg/mL. Bajo las condiciones dadas por el diseño, se extrajeron durante 30 minutos a 25°C, 50°C, 75°C y 100°C. No se estudiaron temperaturas más altas, para no exceder los límites de presión de los viales de vidrio.

En la **Figura IV.3.2.2.1** se representan las respuestas obtenidas para cada compuesto frente la temperatura de extracción.



Se confirma que para todos los compuestos se obtiene mejor eficacia de extracción a la temperatura más alta (100°C). Este efecto es más acusado cuanto mayor es el grado de halogenación del congénere, y por tanto, cuanto mayor es el peso molecular. De hecho, para los hexaBDEs sólo se alcanza una respuesta cuantificable cuando se trabaja a 100°C. A 25°C, sin embargo, las respuestas son muy bajas, indicando que el proceso de extracción presenta una cinética muy lenta a esta temperatura, excepto para el BDE-3 (congénere más ligero).

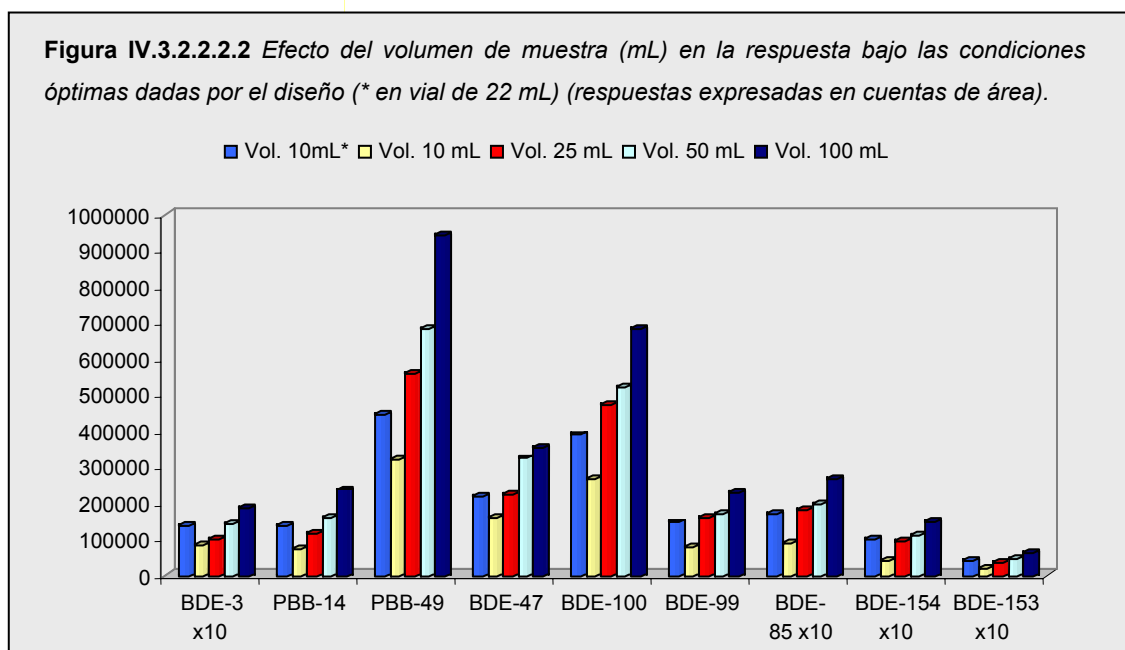
En cuanto al efecto del volumen de las fases, éste dependerá de las constantes de distribución de los analitos entre las distintas fases que componen el sistema<sup>23-25</sup>, y por tanto, su estudio resulta complejo, sobre todo, bajo condiciones de no equilibrio, ya que influye tanto en los aspectos cinético como termodinámicos de la microextracción.

Considerando sólo los aspectos termodinámicos, el incremento del volumen del espacio de cabeza debería disminuir la respuesta, si la capacidad de esta fase es importante, o no afectar a la respuesta, si la capacidad de esta fase es despreciable.

Por otra parte, la sensibilidad del proceso de SPME es proporcional a la cantidad de analito en la muestra, por lo que es de esperar que al aumentar el volumen de muestra aumente la respuesta. Aunque si se tienen en cuenta los conceptos teóricos, al aumentar el volumen de muestra hasta hacer despreciables las capacidades del recubrimiento de fibra y del espacio de cabeza (se alcanza el volumen infinito de muestra), la respuesta deja de aumentar con el volumen de muestra<sup>26</sup>.

En este caso, para el estudio de la influencia del volumen de muestra, se analizaron diferentes volúmenes de muestra, desde 10 a 100 mL, en viales de 120 mL. Además, para evaluar también la influencia del volumen del HS, cuando la cantidad de muestra se mantiene constante, se analizaron alícuotas de 10 mL en viales de 22 mL.

Los resultados obtenidos en este estudio para cada compuesto se recogen en la **Figura IV.3.2.2.2.2**.



Como se indica, las dos primeras barras de la gráfica corresponden al mismo volumen de muestra (10 mL) con diferente volumen de HS, 12 y 110 mL respectivamente. Así, se aprecia como las respuestas son menores para el experimento con mayor volumen de HS. Sin embargo, para estas experiencias es necesario puntualizar que el HS no es la única variable a tener en cuenta, sino que también cambia la superficie de contacto entre fases al cambiar la forma del vial (mayor superficie de contacto en los viales de 120 mL), la eficacia de la agitación (es más efectiva para los viales de 22 mL) y por tanto la cinética de extracción, por lo que los resultados deben interpretarse con cautela.

En el resto de experiencias el volumen de muestra aumenta a 25, 50 y 100 mL, en viales de 120 mL, por tanto, el volumen de HS disminuye proporcionalmente. Según las respuestas obtenidas, se ve como al aumentar el volumen de muestra y consecuentemente disminuir el espacio de cabeza, aumenta la cantidad de analito extraída por la fibra en el espacio de cabeza, aunque este aumento es menos acusado entre 50 y 100 mL, salvo para los derivados hexabromados.

De todos modos, si se comparan los resultados obtenidos para 10 mL de muestra en vial de 22 mL con los obtenidos para 100 mL en vial de 120 mL, las respuestas son sólo un 30% inferiores al muestrear 10 mL; y teniendo en cuenta que una de las máximas perseguidas en el desarrollo de nuevos métodos de análisis es el de reducir el tamaño de muestra necesario y minimizar los residuos generados, se decidió trabajar con 10 mL de muestra en viales de 22 mL.

#### IV.3.2.2.3 Estudio del efecto memoria

En este estudio se pretende estudiar el efecto memoria de la fibra de PDMS propuesta en el método, es decir, evaluar la proporción de analitos que quedan retenidos en la fibra, tras la desorción normal en el inyector del cromatógrafo de gases durante 2 minutos.

Parar ello se realizaron varias extracciones con la fibra PDMS en el espacio de cabeza de 100 mL de muestra acuosa con concentraciones de 200 pg/mL para BDE-3, PBB-15 y PBB-49, 82 pg/mL para BDE-47 y BDE-99, 24 pg/mL para BDE-100, 10 pg/mL para BDE-85, 6 pg/mL para BDE-154 y 4 pg/mL BDE-153 (mezcla técnica "pentamix") en vial de 120 mL, con agitación de la muestra, durante 1 hora. Tras la desorción de la fibra en el inyector del cromatógrafo, y finalizado el análisis de la muestra, se reinyectó la fibra.

El efecto memoria de la fibra de PDMS fue inferior a un 1‰ para la mayoría de los compuestos, incluso los de mayor peso molecular, salvo para el BDE-154, con un 13‰ de efecto memoria.

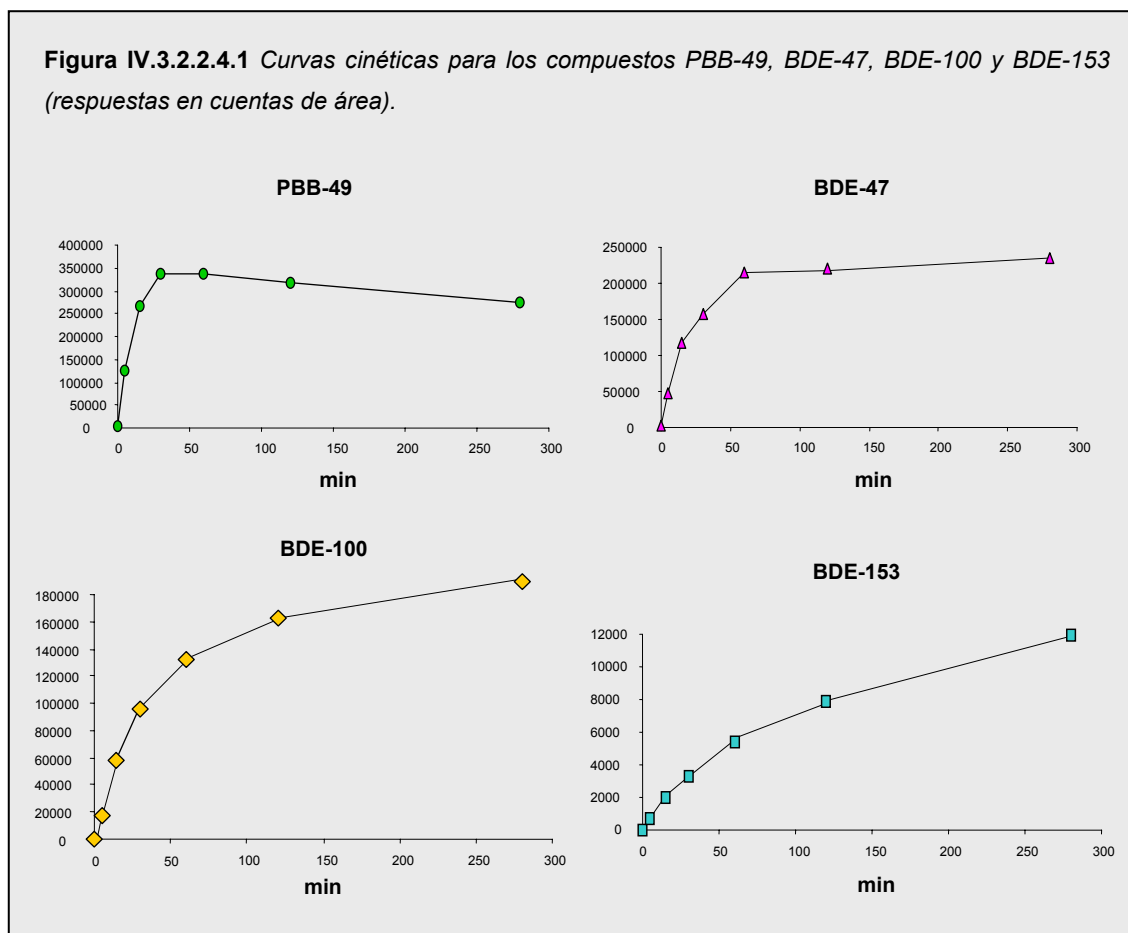
Por tanto, se puede afirmar que la desorción de los analitos extraídos en el inyector del cromatógrafo de gases para su cuantificación a 280°C durante 2 minutos es completa.

## IV.3.2.2.4 Estudio cinético de la HSSPME de PBBs Y PBDEs

Mediante el estudio de las cinéticas de extracción de los PBDEs y PBBs incluidos en este trabajo, se pretende evaluar su comportamiento al aumentar el tiempo de extracción, y si interesa o no, dados los resultados obtenidos, prolongar el proceso de microextracción.

Para ello, se realizaron una serie de experimentos, bajo las condiciones ya establecidas, con muestras acuosas adicionadas al nivel de los pg/mL, durante 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 280 minutos.

Las curvas cinéticas obtenidas se muestran en la **Figura IV.3.2.2.4.1**.



De las gráficas, se deduce que el tiempo que tarda cada analito en alcanzar el equilibrio está relacionado con el grado de bromación del compuesto. Así, el BDE-3, un monoBDE, alcanza el equilibrio en pocos minutos, mientras el PBB-15 (diPBB) a los 15 minutos y el PBB-49 (tetraPBB) a los 30 minutos. Para el BDE-47, se necesitan 60 minutos para alcanzarlo, y para los congéneres más bromados, pentaBDEs y hexaBDEs, no se llega al equilibrio en los 280 minutos de exposición de la fibra, aunque observando la forma de las curvas cinéticas se puede suponer que están en una situación próxima al equilibrio. Para estos compuestos, teniendo en cuenta el objetivo del trabajo, no interesa trabajar en condiciones de equilibrio, ya que prolongaría en exceso el proceso de microextracción.

Seleccionando 30 minutos como tiempo de extracción, las respuestas obtenidas son satisfactorias, y al mismo tiempo, resulta adecuado para el análisis rutinario. En este caso, el proceso de extracción de los tetra, penta y hexaBDEs estará controlado por la cinética.

#### IV.3.2.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO

La validación de un método analítico se definió en el **apartado II.5.2** del capítulo de Introducción, como el proceso mediante el cual se establece por medio de diferentes estudios, que las características representativas del método analítico, cumplen con las especificaciones para su aplicación. Estas características representativas se expresan en términos de parámetros analíticos y estadísticos, como la linealidad, la repetibilidad, la exactitud y la sensibilidad del método.

Para el estudio de estas características analíticas del método, se utilizaron las condiciones experimentales optimizadas por el diseño y por los estudios posteriores, y que se resumen en la **Tabla IV.3.2.3.1**.

**Tabla IV.3.2.3.1** Condiciones experimentales del método propuesto para la determinación de PBBs y PBDEs en muestras de agua.

Factor	Valor seleccionado
Fibra	PDMS
Temperatura	100°C
Modo de muestreo	HSSPME
Volumen de muestra	10 mL
Volumen del vial	22 mL
Agitación	Si (magnética)
Adición de sal	0%
Tiempo de extracción	30 min

#### IV.3.2.3.1 Estudio de la linealidad, LODs y repetibilidad del método

El estudio de la linealidad del método, se realizó mediante la obtención de curvas de calibrado empleando disoluciones en agua ultrapura en el rango de concentraciones para cada compuesto indicado en la **Tabla IV.3.2.3.1.1**. Cada nivel de concentración se analizó por duplicado o por triplicado.

Las curvas de calibrado fueron lineales en todo el rango de concentraciones estudiado y los valores de los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) fueron iguales o superiores a 0.997 para todos los compuestos (excepto para el BDE-3), demostrando que existe una relación directamente proporcional, en este caso lineal, entre la cantidad de analito extraída y la que existe inicialmente en la muestra para el rango de concentraciones estudiado.

Además, se calcularon los LODs para cada congénere, que también se incluyen en la tabla, como la concentración correspondiente a una señal analítica tres veces superior al ruido de fondo, encontrándose comprendidos entre 7.5 pg/L para el PBB-49 y 190 pg/L para el BDE-3.

**Tabla IV.3.2.3.1.1.** Intervalos de concentración, coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y límites de detección (LODs) obtenidos en el estudio de la linealidad del método.

Compuesto	Intervalo de concentración (pg/mL)	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	LODs (S/N=3, pg/L)
<b>BDE-3</b>	1-500	0.9977	190
<b>PBB-15</b>	1-500	1.000	9.0
<b>PBB-49</b>	1-500	1.000	7.5
<b>BDE-47</b>	0.41-205	0.9998	20
<b>BDE-100</b>	0.12-60	1.000	60
<b>BDE-99</b>	0.41-205	0.9999	47
<b>BDE-85</b>	0.1-5	0.9991	49
<b>BDE-154</b>	0.3-15	1.000	150
<b>BDE-153</b>	0.2-10	0.9995	100

La repetibilidad se estudió a dos niveles de concentración diferentes y realizando las pruebas por triplicado.

En la **Tabla IV.3.2.3.1.2** se muestran los valores de RSD calculados en tanto por cien para cada nivel.



Tabla IV.3.2.3.1.2 Repetibilidad del método propuesto.

Compuesto	Concentración (pg/mL)	Repetibilidad (RSD %, n=3)	Concentración (pg/mL)	Repetibilidad (RSD %, n=3)
BDE-3	10.0	4.4	199	6.3
PBB-15	10.1	3.8	201	12
PBB-49	9.5	2.8	190	1.7
BDE-47	4.1	17	82	1.2
BDE-100	1.2	15	24	10
BDE-99	4.1	20	82	9.3
BDE-85	0.1	-	2.0	10
BDE-154	0.3	24	6.8	9.3
BDE-153	0.2	26	4.6	8.8

Se puede concluir que la repetibilidad del método es buena dado que para el nivel más bajo, la variación se encontró entre 3.8% para el PBB-15 y 26% para el BDE-153, y entre 1.2% para el BDE-47 y 12% para el PBB-15, al nivel más alto de concentración.

#### IV.3.2.3.2. Estudio de la recuperación. Aplicación a muestras reales.

El método SPME-GC-MS, una vez optimizado, se aplicó a la determinación de los compuestos estudiados (dos PBBs y siete BDEs) en muestras reales de agua, en concreto a agua de grifo y a aguas residuales urbanas, antes y después de su tratamiento, es decir, muestras de influente y efluente de una planta de tratamiento, respectivamente.

En el análisis inicial de las muestras no se detectaron concentraciones al nivel de los LODs para ningún compuesto, por lo que se utilizaron para estudios de recuperación.

Con los estudios de recuperación, se pretende estudiar la capacidad del método de dar resultados verdaderos, es decir, su exactitud. En este caso, se expresa como el porcentaje de recuperación entre la respuesta medida y el valor verdadero.

Las muestras se filtraron y se fortificaron con estándares acetónicos de los analitos para obtener las concentraciones resumidas en la **Tabla IV.3.2.3.2.1**.

La concentración de los compuestos se determinó por el método de calibrado externo. Tras el análisis, se calcularon las recuperaciones que, como se ve en **Tabla IV.3.2.3.2.1**, fueron cuantitativas para todos los compuestos por lo que no se produce efecto matriz.

**Tabla IV.3.2.3.2.1** Recuperación (expresada en %) de los PBDEs y PBBs para las tres muestras reales estudiadas.

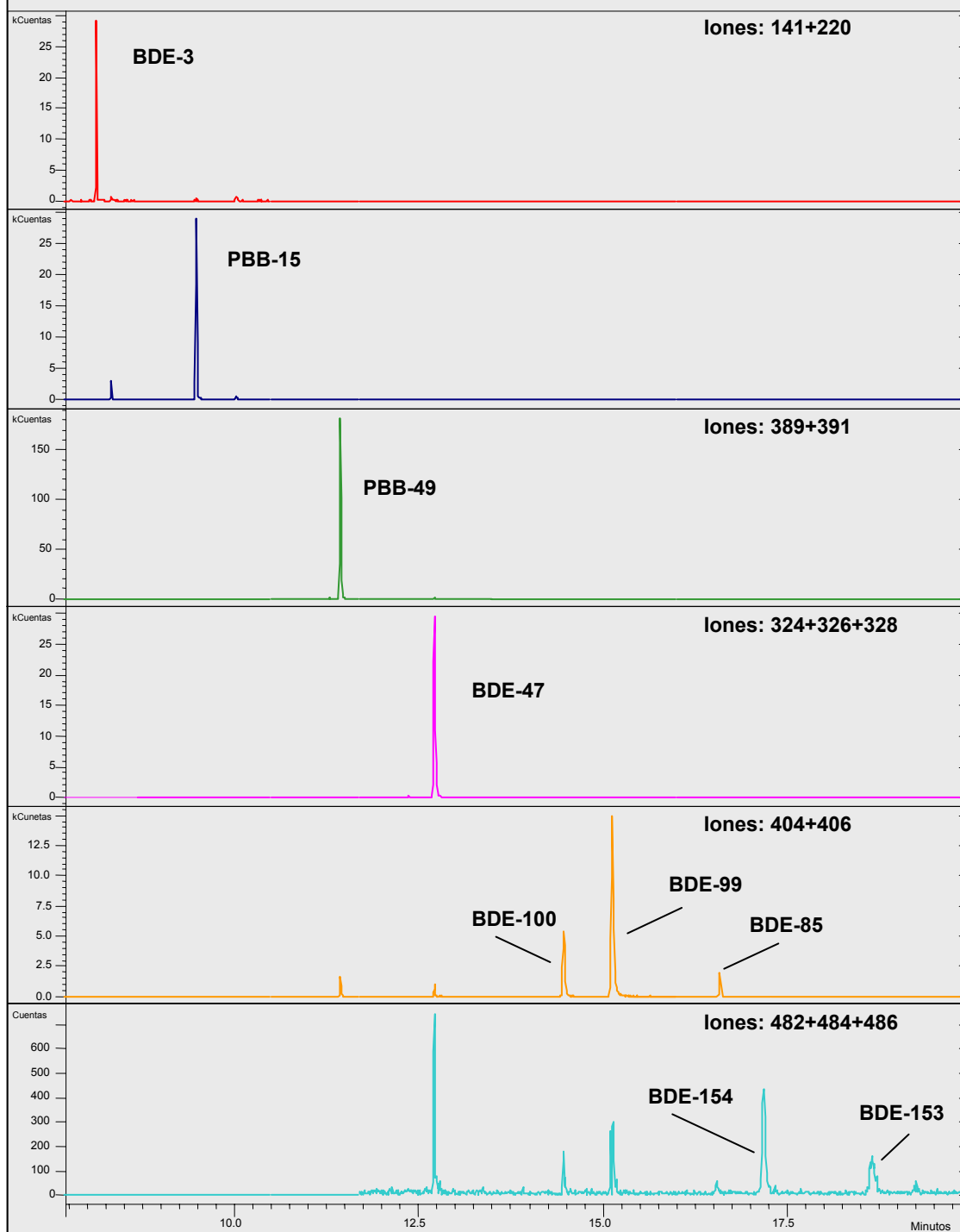
Muestra Compuesto	Agua de grifo		Efluente		Influyente	
	Concentración (pg/mL)	Recuperación ±RSD (%)	Concentración (pg/mL)	Recuperación ±RSD (%)	Concentración (pg/mL)	Recuperación ±RSD (%)
BDE-3	1.00	99±1	10.0	100±4	199	106±10
PBB-15	1.01	97±4	10.1	92±2	201	90±6
PBB-49	0.95	90±21	9.5	94±1	190	93±5
BDE-47	0.41	91±8	4.1	97±7	82	83±7
BDE-100	0.12	100±4	1.2	83±17	24	95±4
BDE-99	0.41	87±19	4.1	90±12	82	92±8
BDE-85	0.010	nd	0.10	95±15	2.0	82±10
BDE-154	0.034	nd	0.34	100±25	6.8	74±11
BDE-153	0.023	nd	0.23	117±13	4.6	82±11

En la **Figura IV.3.2.3.2.1** se muestran el cromatograma de iones de la muestra de influente adicionada con las concentraciones indicadas en esta tabla.

En conclusión, la validación del método analítico propuesto demuestra que las características representativas del mismo cumplen con las especificaciones para su aplicación en el análisis de los compuestos estudiados a nivel traza en muestras de agua y aguas residuales. Además reúne las cualidades para ser considerado un método fiable, reproducible y sobre todo sensible, es decir, permite alcanzar límites de detección muy bajos, adecuados al nivel de cuantificación requerido para el cumplimiento de la Directiva comunitaria 2006/0129 (COD) de reciente aprobación por el Parlamento europeo<sup>27</sup>.

Los resultados de este estudio se han publicado en la revista **Analytical Chemistry** **76** (2004) **1054**, que se adjunta en el Anexo VI.2.

**Figura IV. 3.2.3.2.1** Cromatograma de iones de una muestra de influente con adición de los compuestos al nivel de concentración indicado en la Tabla IV.4.2.3.3.1.



**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) T. McDonald, Chemosphere 46 (2002) 745.
- (2) Environmental Health Criteria 192. Flame retardants: A General Introduction; World Health Organization (WHO), Ginebra, Suiza, 1994.
- (3) J. H. Christensen, J. Platz, J. Environ. Monit. 3 (2001) 543.
- (4) M. Alaei, D. B. Sergeant, M. G. Ikononou, J. M. Luross, Chemosphere 44 (2001) 1489.
- (5) S. Lacorte, M. Guillaumon, E. Martínez, P. Viana, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 892.
- (6) U. Sellström, A. Kierkegaard, C. de Wit, B. Jansson, L. Asplund, L. Bergander, A. Bignert, T. Odsjö, M. Olsson, Organohalogen. Compd. 28 (1996) 526.
- (7) U. Sellström, A. Kierkegaard, C. de Wit, B. Jansson, Environ. Toxicol. Chem. 17 (1998) 1065.
- (8) U. Sellström, B. Jansson, Chemosphere 31 (1995) 3085.
- (9) B. Van Bavel, E. Sundelin, J. Lillback, M. Dam, G. Lindstrom, Organohalogen. Compd. 40 (1999) 359.
- (10) P. Landín, M. Llompart, M. Lourido, R. Cela, J. Microcolumn Sep. 13 (2001) 275.
- (11) P. Landín, M. Llompart, M. Lourido, C. García-Jares, N. Carro, R. Cela, J. AOAC Int. 86 (2003) 44.
- (12) Ch. Brochu, S. Moore, G. Hamelin, Nota de aplicación Varian 64, 2000.
- (13) M. Laušević, M. Splendore, R. E. March, J. Mass Spectrom. 31 (1996) 1244.
- (14) J. B. Plomley, R. S. Mercer, R. E. March, Organohalogen. Compd. 23 (1995) 7.
- (15) D. G. Hayward, K. Hooper, D. Andrzejewski, Anal. Chem. 71 (1999) 212.
- (16) J.-W. Choi, S. Fujimaki, K. Kitamura, S. Hashimoto, H. Ito, N. Suzuki, S.-I. Sakai, M. Morita, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 817.
- (17) A. Sjödin, D. G. Patterson, A. Bergman, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3830.
- (18) V. Pino, J. H Ayala., A. M. Afonso, V. González, Anal. Chim. Acta 477 (2003) 81.

- (19) R. Doong, S. Chang, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3647.
- (20) E. Shirey, R. F. Mindrup, Supelco, Nota de Aplicación Sigma-Aldrich, 1999.  
[<http://info.sial.com/Graphics/Supelco/objects/8000/7943.pdf>].
- (21) A. Palm, I. T. Cousins, D. Mackay, M. Tysklind, C. Metcalfe, M. Alaei, *Environ. Pollut.* 117 (2002) 195.
- (22) M. Möder, P. Popp, R. Eisert, J. Pawliszyn, *Fresenius J. Anal. Chem.* 610 363 (1999) 680.
- (23) J. J. Langefeld, S. B. Hawthorne, D. J. Miller, *Anal. Chem.* 68 (1996) 144.
- (24) T. Gorecki, J. Pawliszyn, *Analyst* 122 (1997) 1079.
- (25) T. Gorecki, A. Khaled, J. Pawliszyn, *Analyst* 123 (1998) 2819.
- (26) Pawliszyn, J. *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*; Wiley-VCH: Nueva York, 1997.
- (27) Comisión de las Comunidades Europeas. Propuesta 2006/0129 (COD) de la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Bruselas, 17-7-2006.



#### IV.4 ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE MICROEXTRACCIÓN ( $K_{fs}$ ) DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs)

Debido a la diversidad de aplicaciones de los BFRs, su distribución en el medioambiente se puede producir a través de múltiples fuentes y rutas de transporte. Los PBDEs y los PBBs, son de los grupos más estudiados en cuanto a su determinación analítica en muestras ambientales; sin embargo, todavía no existe suficiente información acerca de sus efectos sobre la salud humana, aunque ya se han demostrado efectos tóxicos en ensayos de laboratorio.

Por tanto, resulta necesario un estudio más completo sobre las propiedades físico-químicas de estos compuestos, con el objetivo de conocer su potencial distribución, bioacumulación y toxicidad en el medioambiente.

En el Capítulo anterior, se demostró la aplicación de la SPME como técnica analítica en la determinación de los PBDEs y los PBBs. La SPME presenta, además, otras aplicaciones, tal como se comentaba en el capítulo de Introducción, como la determinación de los coeficientes de microextracción ( $K_{fs}$ ) que pueden servir como base para la estimación de la lipofilia y bioacumulación de un compuesto, a través de su correlación con los coeficientes de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ).

Así, el objetivo de este capítulo de la Tesis se centró, por una parte, en la estimación de los coeficientes de partición entre la fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) y muestras de agua, basándose en la depleción mediante extracciones múltiples como método de calibración, y por otra, en establecer una correlación entre estos coeficientes y los  $K_{ow}$  para estos compuestos.

Este método se utilizó previamente con éxito en la determinación de los coeficientes de microextracción para otros compuestos de bajo peso molecular<sup>1,2,3</sup>.

Los resultados obtenidos en este estudio se desarrollan y discuten a continuación.

#### **V.4 ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE MICROEXTRACCIÓN ( $K_{fs}$ ) DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs)**

<b>IV.4.1 FUNDAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>235</b>
<b>IV.4.2 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>238</b>
<i>IV.4.2.1 Patrones y muestras.....</i>	<i>238</i>
<i>IV.4.2.2 Procedimiento de microextracción en fase sólida.....</i>	<i>238</i>
<i>IV.4.2.3 Condiciones instrumentales de medida.....</i>	<i>240</i>
<b>IV.4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>240</b>
<i>IV.4.3.1 Estudios preliminares de la SPME basados en la cuantificación mediante inyección líquida.....</i>	<i>240</i>
<i>IV.4.3.2 Determinación de <math>K_{fs}</math> mediante depleción.....</i>	<i>243</i>
<i>IV.4.3.3 Correlación entre <math>\log K_{fs}</math>-<math>\log K_{ow}</math>.....</i>	<i>252</i>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>254</b>



#### IV.4.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

Para el fundamento teórico del método utilizado en este estudio, se adoptó una estrategia de cuantificación basada en la microextracción múltiple de una misma muestra y se consideró la eficacia de extracción ( $\alpha$ ) propuesta por *Urruty y Montury*<sup>1</sup>.

La eficacia de extracción representa la porción de analito extraída por la fibra ( $n_{f1}$  para la primera extracción) frente a la cantidad inicial presente en la muestra ( $n_{s0}$ ), y sólo va a depender de las propiedades del recubrimiento polimérico y del analito.

$$n_{f1} = \alpha n_{s0} \quad \text{Ecuación IV.4.1.1}$$

siendo  $\alpha$  para un sistema de tres fases en equilibrio ( $\alpha_{eq}$ ):

$$\alpha_{eq} = K_{fs} V_f / (K_{hs} V_h + K_{fs} V_f + V_s) \quad \text{Ecuación IV.4.1.2}$$

En donde  $V_f$ ,  $V_s$  y  $V_{hs}$  son los volúmenes del recubrimiento polimérico, de la muestra y del espacio de cabeza sobre la muestra, respectivamente; mientras que  $K_{fs}$  es el coeficiente de partición entre la fibra y la muestra y  $K_{hs}$  el coeficiente de partición entre la muestra y el espacio de cabeza. En el caso de los PBDEs y PBBs, la capacidad del espacio de cabeza puede considerarse despreciable frente a la capacidad de la fase acuosa teniendo en cuenta sus valores de la constante de Henry (ver **Apartado II.3.1.1.1**)<sup>4</sup>.

Después de la primera extracción, la cantidad de analito que permanece en la muestra puede calcularse como una fracción de la cantidad inicial ( $n_{s0}$ ) según la siguiente ecuación:

$$n_{s1} = n_{s0} - n_{f1} = n_{s0} - \alpha n_{s0} = n_{s0}(1 - \alpha) \quad \text{Ecuación IV.4.1.3}$$

Mediante la realización de  $x$  extracciones consecutivas, el descenso en la cantidad de analito que queda después de la extracción puede determinarse mediante la siguiente ecuación general<sup>2</sup>:

$$n_{sx} = n_{s0}(1 - \alpha)^x \quad (4) \quad \text{Ecuación IV.4.1.4}$$

La cantidad de analito en la muestra disminuye exponencialmente en función de esta ecuación, de acuerdo con el estudio publicado por *Arthur et al.*<sup>5</sup>.

Respecto a la cantidad de analito extraída por la fibra, ésta se puede determinar mediante la siguiente relación entre dos extracciones consecutivas:

$$n_{fx} = n_{sx-1} - n_{sx} = n_{s0}(1-\alpha)^{x-1} - n_{s0}(1-\alpha)^x = n_{s0}\alpha(1-\alpha)^{x-1} \quad \text{Ecuación IV.4.1.5}$$

Se puede obtener una expresión similar en términos cromatográficos considerando la relación lineal que existe entre la respuesta para SPME y la concentración inicial en la muestra demostrada en el capítulo anterior (ver **Apartado IV.3.2.3.1**):

$$A_x = A_T \alpha (1-\alpha)^{x-1} \quad \text{Ecuación IV.4.1.6}$$

En donde  $A_x$  es la señal cromatográfica obtenida (área de pico) para la extracción  $x$  y  $A_T$  es la señal obtenida si se extrajera la cantidad total de analito presente inicialmente en la muestra.

La **Ecuación IV.4.1.6** se puede transformar mediante la aplicación de logaritmos<sup>2</sup>, en la siguiente ecuación:

$$\log(A_x) = \log(A_T \alpha) + (x-1)\log(1-\alpha) \quad \text{Ecuación IV.4.1.7}$$

Si se representa el logaritmo de  $A_x$  frente al número de extracciones  $(x-1)$ , se obtiene una regresión lineal, y la eficacia de extracción puede entonces determinarse fácilmente a partir de la pendiente correspondiente al valor del logaritmo de  $(1-\alpha)$ .

De esta forma, los coeficientes de microextracción para el equilibrio ( $K_{fs}$ ) se pueden calcular a partir de la **Ecuación IV.4.1.2**, considerando sólo  $\alpha_{eq}$  como variable, independientemente de la respuesta del detector para cada compuesto, y sin necesidad de conocer la concentración inicial en la muestra:

$$K_{fs} = \alpha_{eq} V_s / (1 - \alpha_{eq}) V_f \quad \text{Ecuación IV.4.1.8}$$

Sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio a temperatura ambiente para compuestos pesados como son los PBDEs y PBBs, es muy largo, existiendo el riesgo de pérdidas importante debido a la degradación o la adsorción de los compuestos en las paredes de vidrio de los viales.

De acuerdo con  $A_t$ <sup>6</sup>, la cantidad de analito extraída por una fibra de PDMS puede relacionarse con el tiempo de extracción a través de una ecuación exponencial considerando que la difusión entre el recubrimiento polimérico y la muestra acuosa se corresponde con una ecuación cinética de primer orden:

$$n_{ft} = n_{feq}(1 - e^{-bt}) \quad \text{Ecuación IV.4.1.9}$$

Esta ecuación también se puede expresar como respuesta cromatográfica (área de pico):

$$A_t = A_{eq}(1 - e^{-bt}) \quad \text{Ecuación IV.4.1.10}$$

siendo  $A_{eq}$  la respuesta obtenida bajo condiciones de equilibrio y  $b$ , una constante cinética dependiente del tipo de recubrimiento polimérico, del analito y del volumen de muestra.

Dividiendo la **Ecuación IV.4.1.9** por  $n_{s0}$ :

$$(n_t/n_{s0}) = (n_{feq}/n_{s0})(1 - e^{-bt})$$

y teniendo en cuenta la **Ecuación IV.4.1.1**, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\alpha_t = \alpha_{eq}(1 - e^{-bt}) \quad \text{Ecuación IV.4.1.11}$$

siendo  $\alpha_t$  la eficacia de extracción obtenida para el tiempo de extracción  $t$ .

En la **Ecuación IV.4.1.8** se puede sustituir  $\alpha_{eq}$  por:

$$\alpha_{eq} = \alpha_t / (1 - e^{-bt})$$

obteniendo la siguiente ecuación para el cálculo de  $K_{fs}$ :

$$K_{fs} = \alpha_t V_s / (1 - e^{-bt} - \alpha_t) V_f \quad \text{Ecuación IV.4.1.12}$$

De esta ecuación se deduce que  $K_{fs}$  puede estimarse empleando el método de depleción mediante la realización de extracciones múltiples para calcular  $\alpha_t$  (**Ecuación IV.4.1.7**) y las cinéticas de extracción para obtener  $b$  (**Ecuación IV.4.1.10**) mediante el ajuste matemático de las curvas cinéticas.

#### IV.4.2 PARTE EXPERIMENTAL

##### IV.4.2.1 Patrones y muestras

En este estudio se emplearon patrones comerciales de 50 µg/mL en nonano de 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-47), 2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE-99), 2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE-100), 2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE-153) y 2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE-154), suministrados por Wellington Laboratories (Ontario, Canada); y un patrón de 50 µg/mL en isooctano de 2,2',3,4,4'-pentabromodifenil éter (BDE-85), suministrado por AccuStandard (New Haven, USA).

También se utilizó un patrón de 4-bromodifenil éter (BDE-3) de 100 µg/mL en metanol (99.5%), suministrado por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania), y los patrones sólidos comerciales de 3,5-dibromo-1,1'-bifenilo (PBB-15, 97%) y 2,2',4,5'-tetrabromo-1,1'-bifenilo (PBB-49, 99.8 %), de Supelco (Bellefonte, PA). Por pesada, se prepararon disoluciones stock de los compuestos en isooctano con concentraciones de 840 µg/mL y 700 µg/mL, para el PBB-15 y el PBB-49, respectivamente.

A partir de las disoluciones stock se prepararon disoluciones, tanto individuales como mezclas de los nueve congéneres de estudio, en diferentes concentraciones y disolventes según la finalidad del estudio a realizar. Los disolventes empleados, todos ellos de grado analítico, fueron: isooctano, acetona y ciclohexano.

Las muestras de agua con adición de los compuestos, se preparan mediante adición de diferentes volúmenes de estándares acetónicos (entre 10 y 100 µL) conteniendo los compuestos de estudio. Las muestras se homogeneizaron durante 12-20 h sin aplicar agitación y conservadas a 4°C antes de su análisis.

##### IV.4.2.2 Procedimiento de microextracción en fase sólida

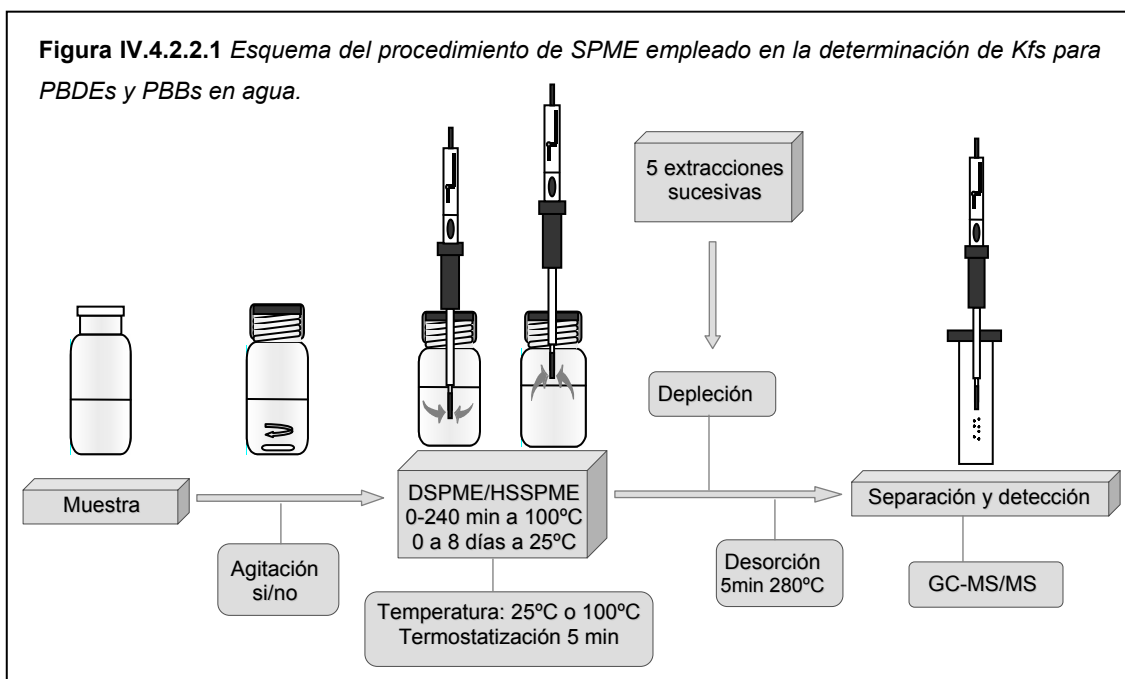
En este estudio se utilizaron fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espesor, las cuales se acondicionaron según las especificaciones del fabricante antes de su primer uso.

Alícuotas de agua Milli-Q con adición de los compuestos al nivel de concentración de pg/mL se depositaron en viales de espacio de cabeza. Los viales se sellaron con cápsulas de aluminio y septa recubiertos internamente de PTFE, y se sumergieron en un baño de agua a la temperatura seleccionada (25 o 100°C).

La muestra se mantuvo en el baño durante 5 min, antes de la extracción, para conseguir la termostatización de la misma. Después, se perforó el septum con una aguja, y se expuso la fibra de PDMS al espacio de cabeza (o directamente a la muestra) durante el tiempo seleccionado, dependiendo del experimento. Los estudios cinéticos se llevaron a cabo de 0 a 240 minutos a 100°C y de 0 a 8 días a 25°C. En las pruebas en las que fue necesaria la aplicación de agitación magnética, se introdujeron barras magnéticas metálicas en los viales y se mantuvo una agitación constante durante todo el proceso de extracción.

Los experimentos de depleción a 25 y 100°C consistieron en la realización de cinco extracciones consecutivas de un mismo vial de muestra.

Una vez finalizado el periodo de exposición, la fibra se insertó inmediatamente en el inyector del cromatógrafo de gases, para llevar a cabo el análisis cromatográfico. La desorción se realizó durante 5 min a 280°C.



#### IV.4.2.3 Condiciones instrumentales de medida

Para los análisis mediante GC-MS/MS, se empleó un cromatógrafo de gases modelo Varian® 3800, provisto de un inyector split/splitless, trabajando en el modo splitless y acoplado a un detector de espectrometría de masas con trampa de iones modelo Varian® Saturn 2000, provisto de un módulo de MS-MS. El control del equipo y el procesamiento de la señal se llevó a cabo con el programa informático Varian® Saturn GC-MS, versión 5.4<sup>16</sup>.

Los parámetros del método de MS/MS empleado para el análisis de estos compuestos se optimizaron en el capítulo anterior y se recogen en las **Tablas IV.3.1.3.1** y **IV.3.1.3.2**, respectivamente.

#### IV.4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### IV.4.3.1 Estudios preliminares de SPME basados en la cuantificación mediante inyección líquida

La calibración mediante inyección directa de estándares es uno de los métodos más utilizados para la cuantificación en SPME; sin embargo, puede presentar problemas si no se optimizan las condiciones de inyección, tal como se apuntaba en el capítulo de Introducción (ver **Apartado II.5.1.1**).

Para evaluar la posibilidad de cuantificar la SPME mediante inyección directa con las condiciones instrumentales indicadas en el **apartado IV.4.2.3**, se llevaron a cabo una serie de experimentos, en los cuales, alícuotas de 5 mL de muestra conteniendo 200 pg/mL de siete PBDEs y dos PBBs, incluyendo un mono- (BDE-3), un di- (PBB-15), dos tetra- (BDE-47 y PBB-49), tres penta- (BDE-100, BDE-99 y BDE-85) y dos hexaBDEs (BDE-154 y BDE-153), se extrajeron a 100°C durante 30 min.

La cantidad de analito extraída por la fibra de PDMS se calculó mediante calibración por inyección directa de soluciones patrón mezcla de los nueve compuestos en isooctano (volúmenes de inyección de 1 µL).

Las eficacias de extracción calculadas como la relación entre la cantidad de analito encontrada (calculada a partir de la curva de calibrado por inyección directa) y la cantidad adicionada a las muestras, se muestran en la **Tabla IV.4.3.1.1**.

**Tabla IV.4.3.1.1.** *Sobrestimación de las eficacias de microextracción mediante calibrado por inyección directa.*

	Compuesto								
	BDE-3	PBB-15	PBB-49	BDE-47	BDE-100	BDE-99	BDE-85	BDE-154	BDE-153
Cantidad inicial de analito en la muestra (ng)	0.47	0.83	0.69	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2
Cantidad de analito extraída (ng)	0.10	0.56	0.73	1.1	1.1	1.1	0.91	0.98	0.92
Eficacia de SPME (%)	22	66	105	98	92	94	81	82	76
Cantidad de analito extraída en reextracción (ng)	0.07	0.24	0.16	0.42	0.49	0.50	0.44	0.41	0.36
Eficacia de la reextracción (%)	16	29	23	36	41	43	39	34	30
Eficacia total (%)	38	95	128	134	133	137	120	116	106

Las eficacias de extracción calculadas de este modo se encuentran muy próximas al 100%, lo que significa que prácticamente la totalidad de analito presente inicialmente en la muestra se extrajo con un único muestreo.

Para verificar la veracidad de estos datos se realizó una reextracción del mismo vial, con el fin de demostrar que la cantidad de analito que queda en el vial tras la primera inyección es muy pequeña. Sin embargo, las eficacias de extracción obtenidas en esta segunda extracción estuvieron entorno al 30-40% para todos los compuestos.

Considerando las dos extracciones la eficacia total es mayor del 100% para la mayoría de los compuestos, por tanto, es obvio que la cantidad de analito extraída por SPME está siendo sobrestimada al utilizar la inyección de estándares para la cuantificación.

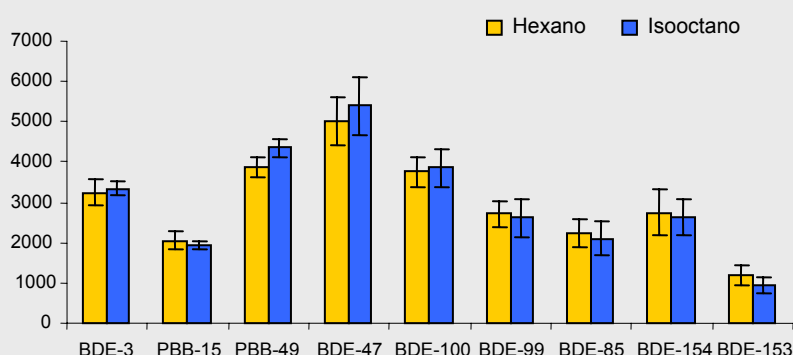
Este hecho revela que la transferencia de masa hacia el sistema cromatográfico, en las condiciones utilizadas (ver **Tabla IV.3.1.3.1**), es diferente si se utiliza la inyección con fibra de SPME o la inyección de disolventes, siendo esta última menos eficaz.

Para mejorar la eficacia de la transferencia en la inyección de estándares, se intentaron optimizar diferentes parámetros, como el tipo de disolvente (isooctano y hexano) y el tiempo de splitless (de 0.5 a 2 min)

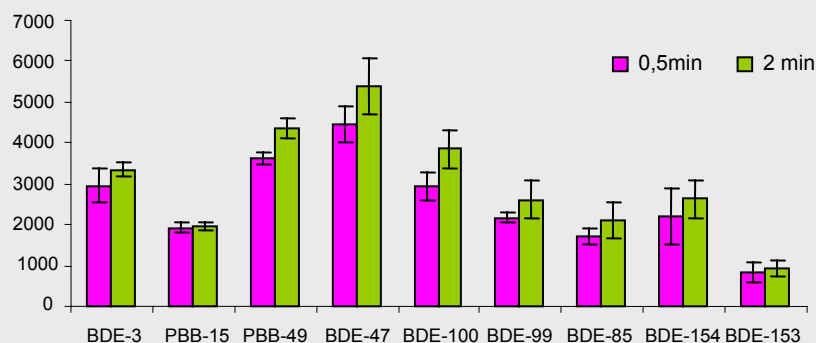
En la **Figura IV.4.3.1.1** se muestra la comparación entre la media de las respuestas obtenidas para cada compuesto en la inyección de 1  $\mu\text{L}$  de estándar de 100 ng/mL, en el primer caso (A), preparado en disolventes diferentes, y en el segundo caso (B), utilizando tiempos de *splitless* diferentes. El intervalo mostrado corresponde a un nivel de confianza del 95%. Tal como se puede observar, no se observan diferencias significativas en las respuestas al modificar el tipo de disolvente, ni al modificar el tiempo de *splitless*.

**Figura IV.4.3.1.1** Comparación entre la media de las respuestas obtenidas para cada compuesto (cuentas de área) en la inyección de 1  $\mu\text{L}$  de estándar:

(A) preparado en disolventes diferentes



(B) utilizando tiempos de *splitless* diferentes



Se ha confirmado que otros factores como el diámetro interno del *liner*, la temperatura del inyector<sup>7</sup> y el volumen de inyección<sup>8</sup>, también son factores críticos a la hora de calibrar SPME por inyección líquida.

Además, en un estudio reciente sobre la influencia de la técnica de inyección y el sistema cromatográfico en la determinación de PBDEs mediante GC, se demostró que durante la inyección cromatográfica se pueden producir fenómenos de discriminación entre los diferentes congéneres, y en consecuencia la precisión empeora si no se seleccionan las



condiciones adecuadas. La inyección *on-column* resultó ser la más eficaz, en función de los datos obtenidos en este estudio<sup>9</sup>.

Teniendo en cuenta estos aspectos sobre la inyección líquida, se decidió emplear una estrategia alternativa para estimar los valores de  $K_{fs}$  de los BFRs basándose en un método de depleción mediante extracciones múltiples.

#### IV.4.3.2 Determinación de $K_{fs}$ mediante depleción

Como se introdujo en el **Apartado II.5.1.1**, la extracción múltiple consiste en realizar extracciones sucesivas del mismo vial.

La estimación de los  $K_{fs}$  requiere conocer la cantidad de analito extraída de forma muy precisa, por lo que debemos asegurarnos de que, durante este procedimiento, no se producen fenómenos de adsorción, ya que estos efectos podrían conducir a resultados erróneos. De hecho, en compuestos de alto peso molecular, como los PCBs, se han demostrado estos fenómenos de adsorción, tanto en las paredes de los viales, como en las barras agitadoras, afectando significativamente al cálculo de los  $K_{fs}$ <sup>10,11,12</sup>.

Por tanto, los primeros experimentos se orientaron hacia el estudio de las posibles pérdidas de los compuestos mediante fenómenos de adsorción.

En estos experimentos, se introdujeron alícuotas de 100 mL de muestra dopada con 100 pg/mL de los compuestos en tres viales de 120 mL. Se colocó también una barra agitadora en cada vial y las muestras se extrajeron a 100°C tal como se describe en el **Apartado IV.4.2.2**, durante 1, 2 y 8 horas, respectivamente.

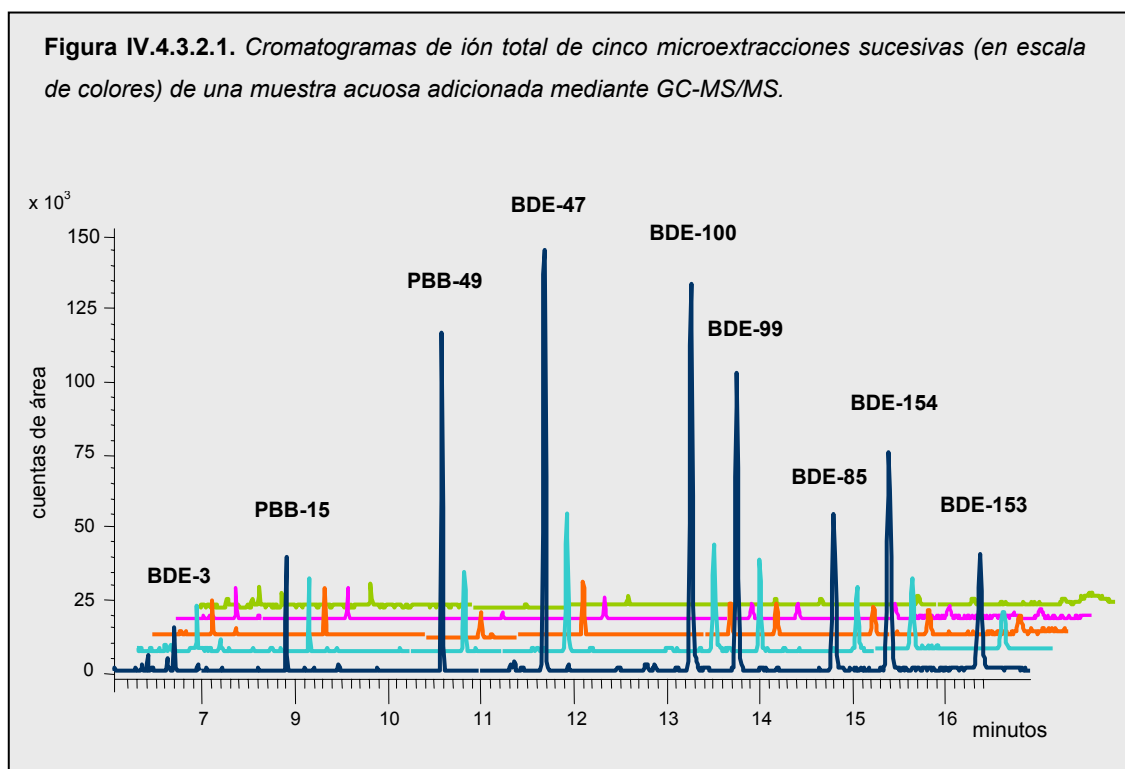
Tras la extracción, a cada uno de los viales y barras agitadoras se les adicionó 10 mL hexano y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos con el fin de extraer la posible cantidad de analito adsorbida sobre las paredes. Los lavados recogidos se inyectaron directamente y, además, se concentraron 5 mL a 100 µL antes de su inyección.

En la inyección directa de los lavados no se detectó ninguno de los compuestos, pero en los concentrados se detectaron BDE-47, BDE-100 y BDE-99. No obstante, las pérdidas por adsorción variaron entre 0.6% para el BDE-47 y 2.8% para el BDE-99, confirmando que no son significativas en el balance de masas total del proceso de microextracción.

Una vez demostrado que los fenómenos de adsorción no son significativos, se llevaron a cabo los experimentos de depleción mediante la realización de extracciones múltiples de una misma muestra con una fibra de 100  $\mu\text{m}$  de PDMS. Se seleccionó esta fibra entre las disponibles comercialmente porque se trata de un polímero líquido, y el proceso de reparto se produce por absorción, fenómeno confirmado mediante imágenes de microscopía fluorescente por Mayer *et al.*<sup>13</sup>, lo que permite considerar un mecanismo de extracción no competitivo e independiente de la concentración<sup>14</sup>, evitándose los posibles efectos de interacción entre compuestos (ver **Apartado II.5.1.3**).

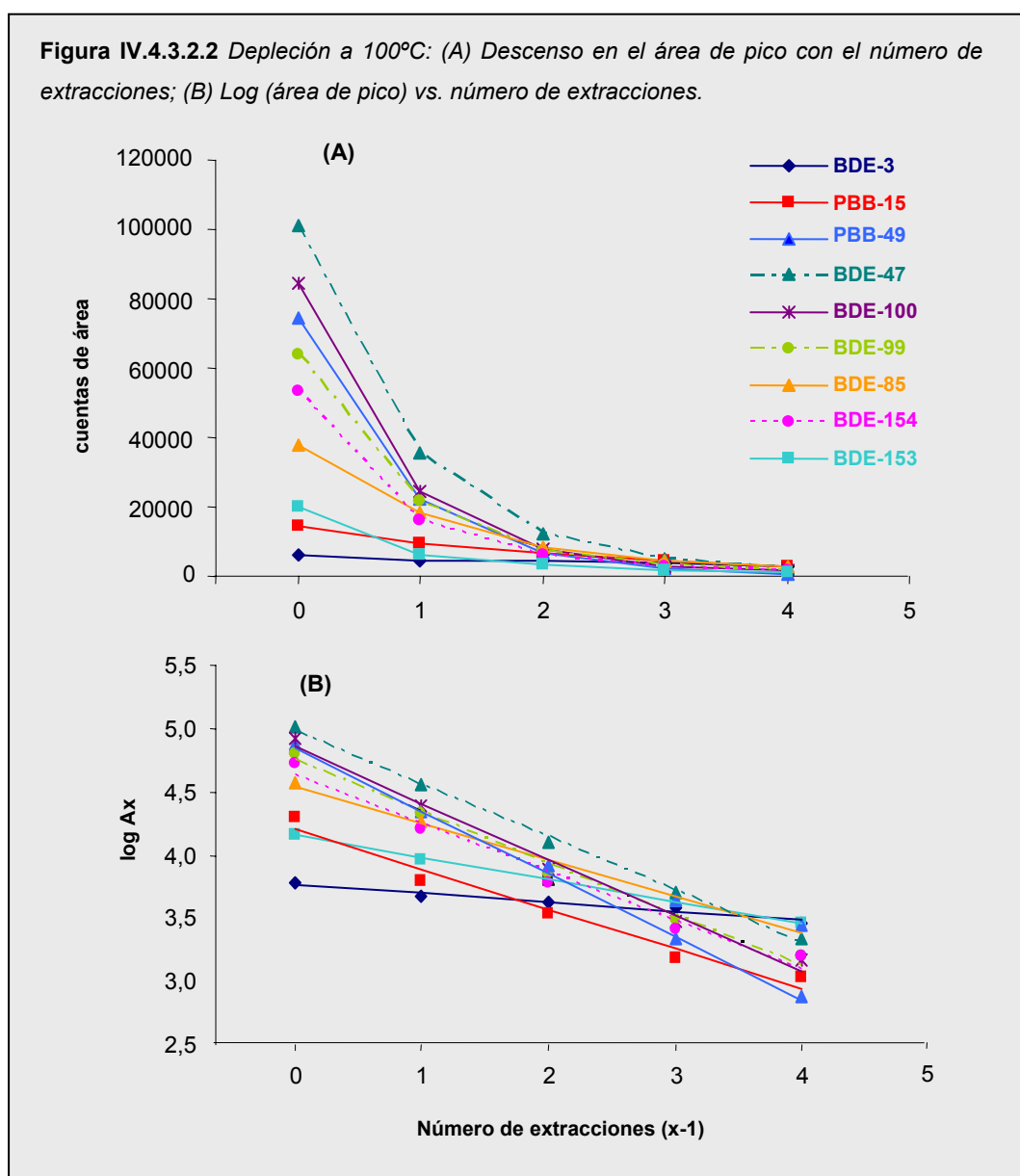
Los primeros experimentos de depleción se realizaron a 100°C. Una única muestra (10 mL) dopada con 200 pg/mL se extrajo en modo espacio de cabeza (10 mL) durante dos horas. Tras este periodo de extracción, la fibra se inyectó en el sistema cromatográfico y, a continuación, se expuso nuevamente al espacio de cabeza del vial para realizar la siguiente extracción.

En la **Figura IV.4.3.2.1** se muestran los cromatogramas obtenidos en cinco extracciones sucesivas de esta muestra. Tal como se puede ver, las áreas de pico para cada compuesto disminuyen progresivamente con cada extracción, aunque se pueden apreciar diferencias entre los congénere. Por ejemplo, mientras que el área de pico para PBB-49 es mayor que el de PBB-15 en la primera extracción, en la segunda extracción el área de pico para ambos compuestos es similar.



Por otra parte, en la **Figura IV.4.3.2.2 (A)** se recogen las curvas de depleción para cada compuestos obtenidas mediante la representación del área de pico frente al número de extracciones ( $x$ ) -1.

Se observa una caída exponencial en la respuesta de acuerdo con la **Ecuación IV.4.1.6**. Esta disminución en la señal se debe a un descenso en la cantidad de analito que permanece en la muestra.



Como se puede apreciar en la Figura, para la mayoría de los compuestos, tras cinco extracciones se consigue extraer significativamente la cantidad de analito inicial en la muestra,

por tanto la extracción múltiple podría utilizarse como técnica de cuantificación mediante un número pequeño de extracciones.

Las diferencias en el comportamiento durante la depleción entre los compuestos de estudios se hace más evidente si se representa el área de pico en forma logarítmica, tal como se muestra en la **Figura IV.4.3.2.2 (B)**.

De acuerdo con la **Ecuación IV.4.1.7**, la eficacia de extracción ( $\alpha_{t=2h}$ ) para cada compuesto se puede calcular a partir de la pendiente de la recta representada.

En al **Tabla V.4.3.2.2** se recogen, junto con el valor de la pendiente para la recta de depleción de cada compuesto, el coeficiente de regresión ( $r^2$ ) y la eficacia de extracción calculada ( $\alpha_{t=2h}$ ).

**Tabla V.4.3.2.2** Pendientes, coeficientes de regresión, eficacias de extracción y logaritmo de los valores de  $K_{fs}$  obtenidos en los experimentos de depleción a 100°C.

Compuesto	Pendiente (1- $\alpha$ )	Coeficiente de regresión ( $r^2$ )	Eficacia de extracción ( $\alpha_{t=2h}$ )	Log $K_{fs}$
<b>BDE-3</b>	-0.07±0.01	0.978	0.15±0.01	3.47
<b>PBB-15</b>	-0.18±0.01	0.994	0.34±0.01	3.91
<b>PBB-49</b>	-0.50±0.02	0.998	0.68±0.01	4.55
<b>BDE-47</b>	-0.43±0.03	0.999	0.63±0.01	4.47
<b>BDE-100</b>	-0.43±0.02	0.995	0.63±0.01	4.73
<b>BDE-99</b>	-0.40±0.03	0.991	0.60±0.01	4.81
<b>BDE-85</b>	-0.31±0.02	0.994	0.51±0.02	4.77
<b>BDE-154</b>	-0.38±0.03	0.990	0.58±0.03	5.21
<b>BDE-153</b>	-0.32±0.03	0.987	0.51±0.03	5.30

Los resultados de depleción se ajustan adecuadamente a un modelo lineal de primer orden, obteniendo un  $r^2 > 0.990$  para la mayoría de los compuestos. Respecto a la eficacia de extracción, los valores más bajos se obtuvieron para los compuestos menos bromados BDE-3 (un monoBDE) y PBB-15 (un diPBB).

Observando con detenimiento la **Figura IV.4.3.2.2 (B)**, se aprecia como la disminución en la cantidad de analito durante las extracciones sucesivas para estos dos compuestos, no es tan marcada como para el resto de BFRs.

Por el contrario, las mayores eficacias de extracción se obtuvieron para los compuestos con mayor grado de bromación, para los cuales se consigue extraer entre un 50 y un 70% de la

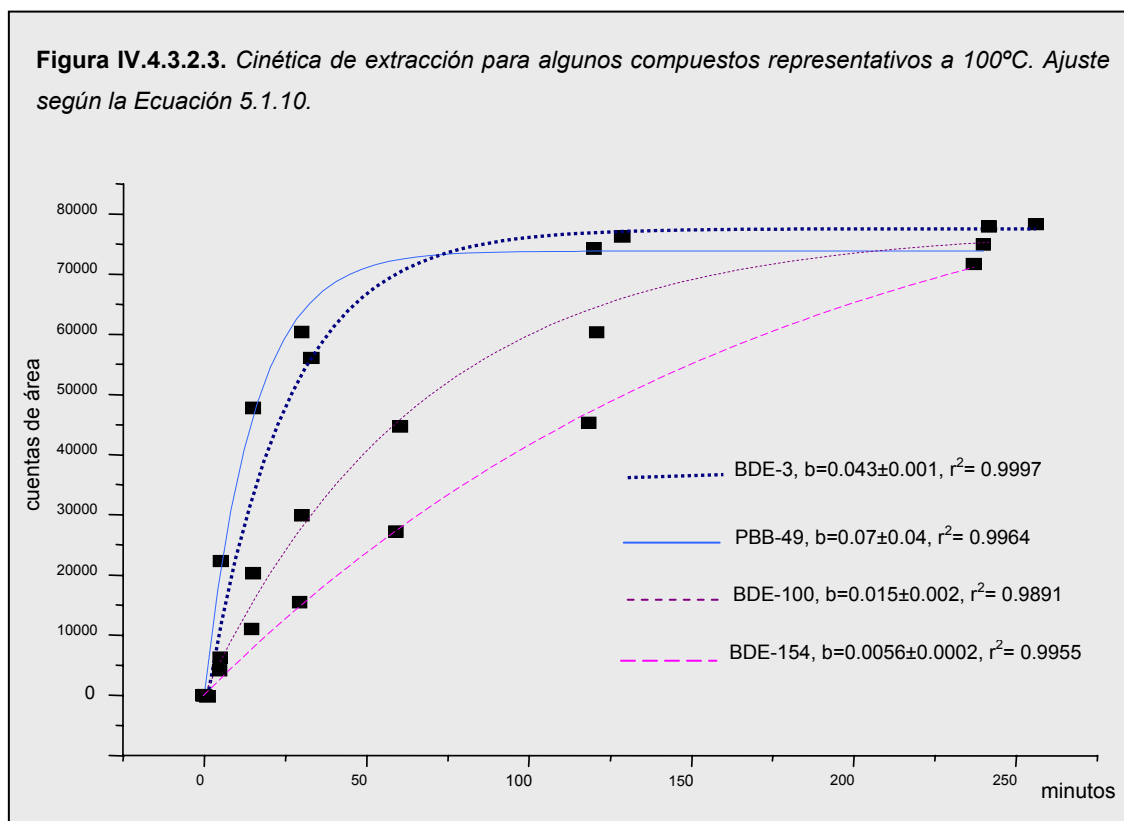
cantidad inicial de analito en la muestra con un sólo muestreo. Este hecho explica la alta sensibilidad obtenida en la aplicación de la SPME al análisis de PBDEs y PBBs desarrollada en el capítulo anterior.

En función de la **Ecuación IV.4.1.8**, los coeficientes de partición ( $K_{fs}$ ) pueden calcularse fácilmente a partir de  $\alpha_{eq}$ , si el sistema se encuentra bajo condiciones de equilibrio; o a partir de  $\alpha_t$  de acuerdo con la ecuación **Ecuación IV.4.1.12**, si aun no se alcanzado el equilibrio. En este caso, es necesario conocer la constante cinética (b).

Para conocer si el sistema se encuentra en equilibrio en las condiciones de los experimentos de depleción, se tomó como referencia el estudio de la cinética de extracción de PBDEs y PBBs incluido en el capítulo anterior (ver **Figura IV.3.2.2.4.1**).

De las curvas cinéticas se concluye que los compuestos menos bromados, incluyendo mono-, di-, y tetra-congénere, alcanzan en el equilibrio en dos horas; mientras que los penta y hexaBDEs no alcanzan el equilibrio con cuatro horas de exposición, aunque parecen estar próximos a esta condición.

La **Ecuación IV.4.1.10** se ajusta bien a los datos obtenidos ( $r^2 > 0.99$ ), tal como se desprende de la **Figura IV.4.3.2.3**, lo cual permite obtener la constante cinética (b).



El logaritmo de los  $K_{fs}$  calculados según la **Ecuación IV.4.1.8** para cada compuesto que alcanzó el equilibrio en dos horas ( $\alpha_{eq}=\alpha_{t=2h}$ ), y según la **Ecuación IV.4.1.12** para los que no alcanzaron el equilibrio se recogen en la **Tabla V.4.3.2.2**. Los valores calculados se encuentran entre 3.47 y 5.30.

Los valores de  $K_{fs}$  aumentan con la lipofilia de los compuestos, la cual viene determinada por el grado de bromación de los compuestos (ver **Apartado II.3.1.1.1**); por tanto, los compuestos más bromados presentan los valores de  $K_{fs}$  más altos, resaltando su gran afinidad por el recubrimiento de PDMS. Por otra parte, no se apreció un descenso en los valores de  $K_{fs}$  con el aumento del peso molecular de los compuestos, confirmando que la distribución de los analitos desde la muestra a la fibra esta controlada por mecanismos de absorción, como se concluyó en estudios previos<sup>13,15</sup>.

El procedimiento de depleción a 100°C se repitió con fibras de PDMS diferentes varios meses después, bajo las mismas condiciones de extracción y cromatográficas, con el objetivo de verificar la reproducibilidad de la aproximación propuesta, no encontrando diferencias significativas en los valores de las eficacias de extracción y  $K_{fs}$  para cada compuesto.

Una vez demostrada la aplicabilidad del método de depleción con los experimentos a 100°C, se llevó a cabo el proceso de depleción a 25°C. En este caso el tiempo de extracción seleccionado para la realización de las extracciones sucesivas fue de 24 horas y el número total de extracciones fue cinco.

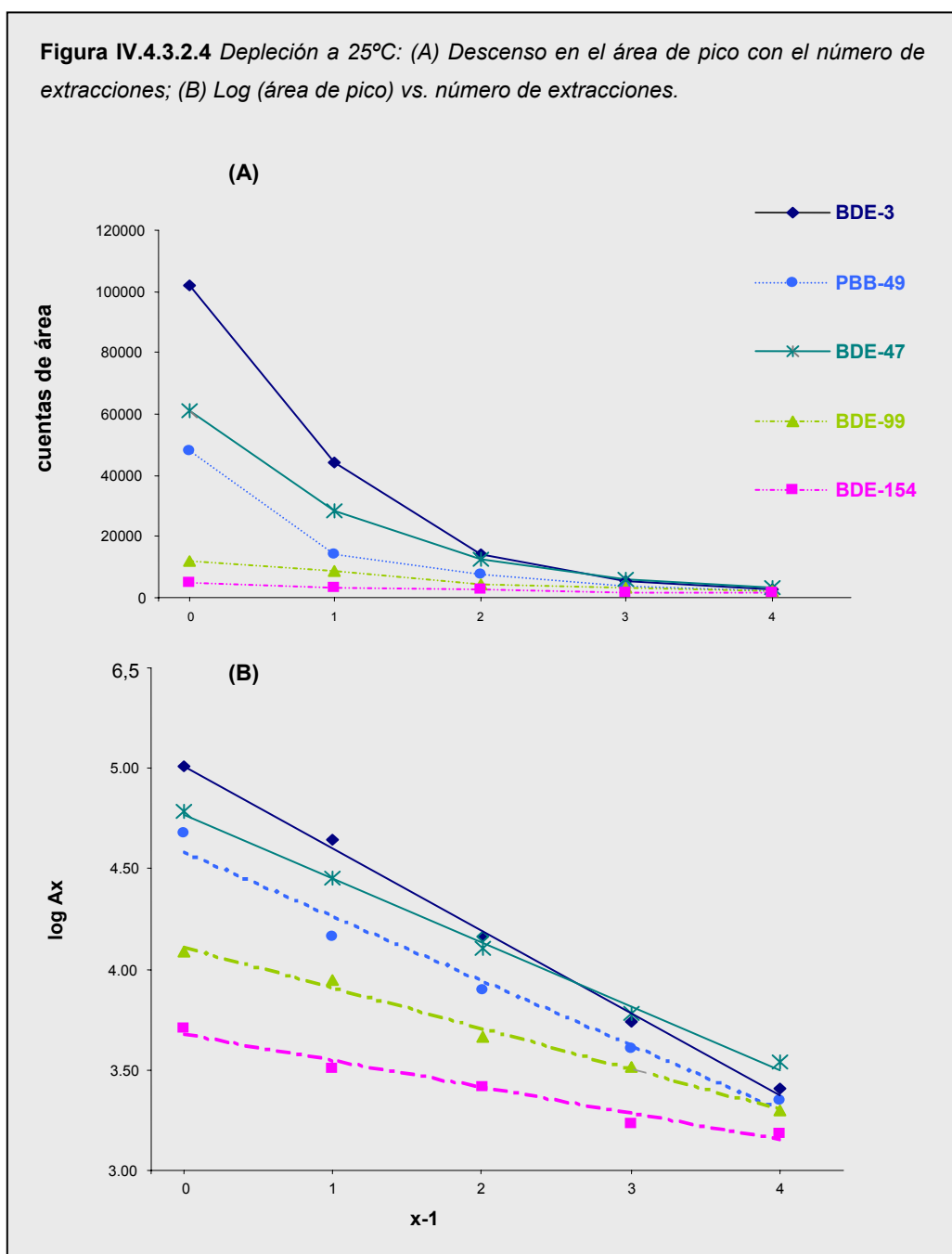
En la **Figura IV.4.3.2.4 (A)** se muestran las curvas de depleción para algunos compuestos representativos obtenidas mediante la representación del área de pico frente al número de extracciones ( $x-1$ ).

Se observa un descenso exponencial en la respuesta para los compuestos menos pesados de acuerdo con la **Ecuación IV.4.1.6**, mientras que para los compuestos de alto peso molecular (penta y hexaBDEs), la disminución en la respuesta no es tan marcada.

Mediante la representación de los logaritmos del área de pico, como muestra la **Figura IV.4.3.2.4 (B)**, la depleción se visualiza mejor. Según la **Ecuación IV.4.1.7**, la eficacia de extracción ( $\alpha_{t=24h}$ ) para cada compuesto se puede obtener a partir de la pendiente de la recta.

Tal como se expuso en la depleción a 100°C, es necesario conocer si el sistema se encuentra en condiciones de equilibrio, por lo que también se incluyó el estudio de la cinética de extracción a 25°C, en este caso prolongando el tiempo de extracción hasta 8 días.

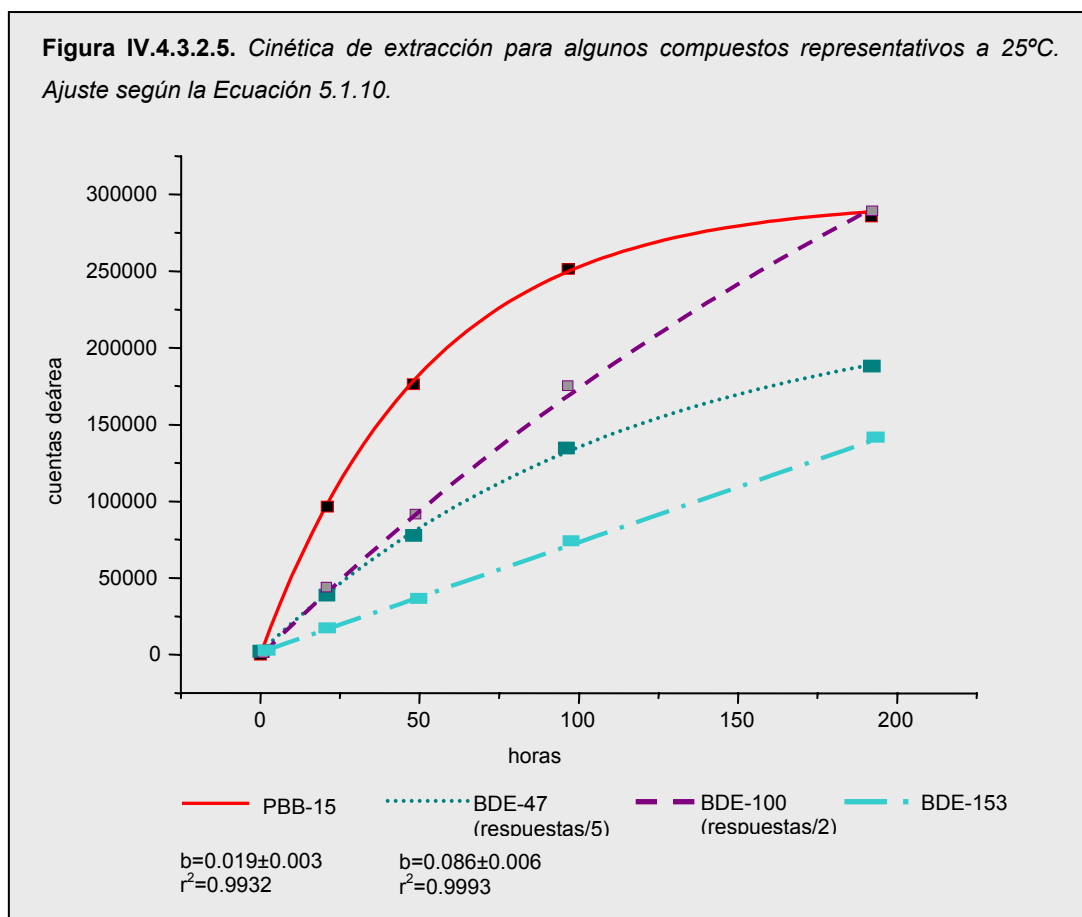
**Figura IV.4.3.2.4** Depleción a 25°C: (A) Descenso en el área de pico con el número de extracciones; (B) Log (área de pico) vs. número de extracciones.



En la **Figura IV.4.3.2.5** se recogen las curvas cinéticas a 25°C para algunos compuestos representativos.

A temperatura ambiente, ningún compuesto de los considerados alcanza el equilibrio en 8 días, excepto BDE-3 y PBB-15; por tanto, es necesario calcular la constante cinética (b) para poder estimar los  $K_{fs}$  de todos los compuestos.

Sin embargo, no todas las curvas cinéticas se ajustan a la **Ecuación IV.4.1.10**. De hecho sólo se consigue un buen ajuste para los compuestos menos bromados (mono-, di- y tetra-congénere), los cuales alcanzan el equilibrio en 8 días o están próximos a alcanzarlo con este tiempo de extracción. No se consiguió un ajuste adecuado para los compuestos más bromados ya que se encuentran muy lejos de las condiciones de equilibrio.



El tiempo de extracción necesario para que estos compuestos alcancen el equilibrio es demasiado largo (posiblemente varias semanas), condiciones que podrían derivar en resultados anómalos ya que no está garantizada la estabilidad de la muestra. Debido a esto, no se consideró el estudio de tiempos de extracción mayores.

En estas circunstancias, se estimaron sólo los  $K_{fs}$  a 25°C para BDE-3, PBB-15, PBB-49 y BDE-47 mediante la **Ecuación IV.4.1.12**.

En la **Tabla IV.45.3.2.3** se incluyen las pendientes de la depleción a 25°C, el coeficiente de regresión ( $r^2$ ), la eficacia de extracción calculada ( $\alpha_{t=24h}$ ) y los logaritmos de  $K_{fs}$  para estos compuestos.



**Tabla IV.4.3.2.3.** Pendientes, coeficientes de regresión, eficacias de extracción y logaritmo de los valores de  $K_{fs}$  obtenidos en los experimentos de depleción a 25°C.

Compuesto	Pendiente (1- $\alpha$ )	Coeficiente de regresión ( $r^2$ )	Eficacia de extracción ( $\alpha_{t=2h}$ )	Log $K_{fs}$
BDE-3	-0.41±0.01	0.997	0.61±0.02	4.23
PBB-15	-0.544±0.003	0.991	0.71±0.02	5.20
PBB-49	-0.32±0.03	0.977	0.52±0.01	5.86
BDE-47	-0.32±0.01	0.996	0.52±0.01	6.05
BDE-100	-0.20±0.01	0.991	0.37±0.03	-
BDE-99	-0.20±0.01	0.990	0.37±0.03	-
BDE-85	-0.24±0.01	0.995	0.42±0.02	-
BDE-154	-0.14±0.03	0.967	0.26±0.03	-
BDE-153	-0.18±0.03	0.927	0.35±0.03	-

A esta temperatura, las eficacias de extracción expresadas como porcentaje se encuentran entre un 40 y un 70%, excepto para los compuestos de mayor grado de bromación. En cuanto a los valores de  $K_{fs}$ , éstos son mayores que los obtenidos a 100°C para BDE-3, PBB-15, PBB-49 y BDE-47, de acuerdo con fundamentos termodinámicos de SPME (ver **Apartado II.4.2.1**). La absorción en la fibra es un proceso exotérmico, por tanto, en condiciones de equilibrio, cuando la temperatura aumenta, la constante de distribución disminuye<sup>18</sup>. El efecto de la temperatura sobre los coeficientes se confirma con los resultados obtenidos. Por otra parte, los  $K_{fs}$  también aumentan respecto a la lipofilia de los compuestos, tal como se encontró a 100°C.

Hasta el momento, no existen datos disponibles sobre los coeficientes de partición de los BFRs, por tanto para poder comparar los datos obtenidos en este estudio con algunos valores de referencia, se decidió tomar los  $K_{fs}$  para PCBs, para los cuales existen varios estudios centrados en su estimación (ver **Tabla IV.4.3.2.4**).

**Tabla IV.4.3.2.4.** Comparación del logaritmo de los valores de  $K_{fs}$  obtenidos para los PCBs en otros trabajos publicados y los obtenidos para los PBDEs y PBBs en el presente estudio.

Nº de sustitución	Log $K_{fs}$				
	PCBs <sup>13</sup>	PCBs <sup>19</sup>	PCBs <sup>20</sup>	PBDEs y PBBs a 100°C	PBDEs y PBBs a 25°C
Di	5.11	-	4.65	3.91	5.20
Tetra	5.49-5.80	5.38	5.14	4.47-4.45	5.86-6.05
Penta	5.61-5.73	5.71-5.89	5.48	4.73-4.81	-
Hexa	5.44-5.52	6.16-6.28	6.01	5.21	-

Los  $K_{fs}$  para los congéneres homólogos de los PCBs aumentan con el grado de cloración. Esta tendencia sigue la misma pauta que la encontrada para los compuestos bromados considerados en este trabajo. Sin embargo, en uno de los estudios es evidente que se produce una progresiva subestimación de los  $K_{fs}$  para los compuestos con mayor número de cloros<sup>13</sup>; lo que podría deberse a un procedimiento experimental inadecuado, tal como se comentó en el **Apartado II.5.1.1** de la Introducción.

El análisis de estos resultados demuestra que el proceso de depleción puede ser una alternativa a las técnicas tradicionales para la estimación de los coeficientes de partición.

#### IV.4.3.3 CORRELACIÓN ENTRE $\log K_{fs}$ - $\log K_{ow}$ y entre $\log K_{fs}$ - $\log BFC$

Los valores de  $K_{ow}$  se utilizan normalmente como una medida de la bioacumulación y por tanto, de la biotoxicidad de un determinado compuesto orgánico.

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios intentando establecer una correlación entre  $\log K_{fs}$  y  $\log K_{ow}$ , con el objetivo de usar los  $K_{fs}$ , mucho más fáciles de calcular, para predecir el comportamiento medioambiental de contaminantes orgánicos<sup>10,11,13,19,21</sup>. Tal como se comentaba en el **Apartado II.5.2**, existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos, obteniéndose en algunos casos buena correlación en todo el rango de  $K_{ow}$ <sup>13</sup> o sólo cuando  $K_{ow} < 6$ <sup>15,22</sup>; y en otros se encuentra una mala correlación en todo el rango<sup>14,19</sup>.

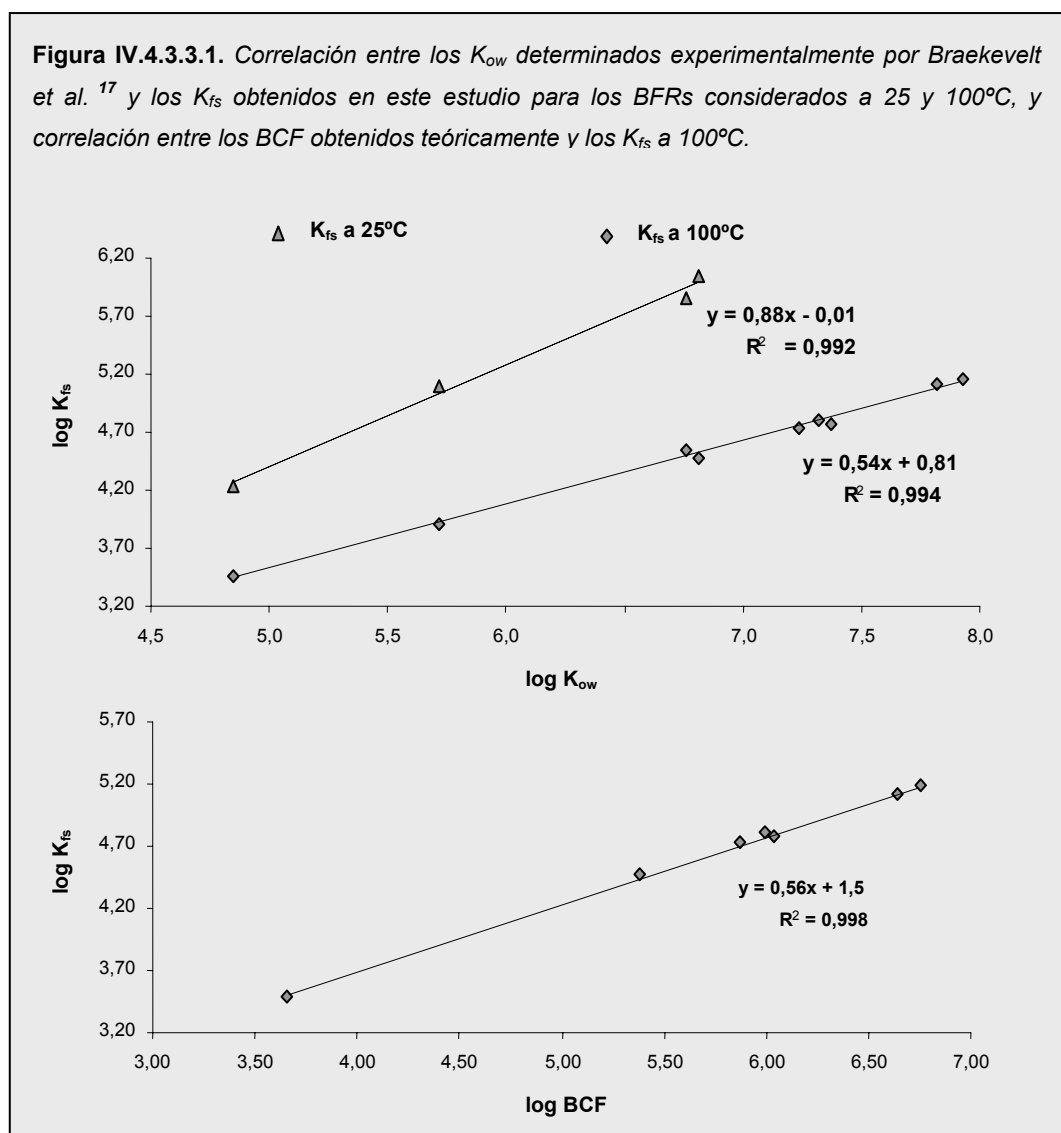
Siguiendo esta línea, se realizó el análisis de regresión de  $\log K_{fs}$  y  $\log K_{ow}$  para los BFRs considerados en este estudio.

Los valores de  $K_{ow}$  para los PBDEs se tomaron de un estudio relativamente reciente en el que se calcularon de forma directa los  $K_{ow}$  de nueve PBDEs mediante la técnica de agitación lenta<sup>17</sup>. Este procedimiento es más laborioso que la SPME. De hecho, los autores necesitaron más de dos meses para obtener los resultados. Los valores de  $\log K_{ow}$  se encuentran entre 6.81, para el BDE-3, y 7.80, para BDE-154, y están relacionados con el contenido de bromo, tal como se encontró en este estudio para los valores de  $K_{fs}$ .

Por su parte, los valores de  $\log K_{ow}$  para los PBBs se tomaron del estudio realizado por Pijnenburg *et al.*<sup>16</sup>.

Los valores de  $K_{fs}$  (a 25 y 100°C), y de  $K_{ow}$  se ajustan bien a un modelo lineal de primer orden, tal como se puede ver en la **Figura IV.4.3.3.1**. Los coeficientes de correlación son altos para ambas temperaturas ( $R^2 > 0.99$ ), y la pendiente para los  $K_{fs}$  a 25°C está próxima a la

unidad, lo cual significa que estos coeficientes podrían usarse como valores de referencia para estimar la biodisponibilidad de los compuestos en el medioambiente.



Otro parámetro importante en el comportamiento ambiental de los compuestos es el factor de bioconcentración (BCF). La correlación entre  $K_{fs}$  y  $\log BCF$  también se incluyó en el estudio. Los valores de BCF se calcularon teóricamente mediante un determinado software<sup>23</sup>. La correlación entre este parámetro y  $K_{fs}$  se muestra también en la **Figura IV.4.3.3.1**.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que los valores de  $K_{fs}$  son tan adecuados como los  $K_{ow}$  para estimar el potencial de bioacumulación de los contaminantes orgánicos en los tejidos grasos de los animales.

Este estudio se ha publicado en la revista **Journal of Chromatography A 1124 (2006) 12**, artículo que se adjunta en el Anexo IV.2.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) L. Urruty, M. Montury, J. Chromatogr. Sci. 37 (1999) 277.
- (2) T. Zimmermman, W.J. Ensinger, T.C. Schmidt, J. Chromatogr. A 1102 (2006) 51.
- (3) L. Nardi, J. Chromatogr. A 985 (2003) 39.
- (4) S.A. Titlemier, T. Halldorson, G.A. Stern, G.T. Tomy, Environ. Toxicol. Chem. 21 (2002) 1804.
- (5) C.L. Arthur, M.L. Killam, K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 64 (1992) 1960.
- (6) J. Ai, Anal. Chem. 69 (1997) 179.
- (7) G. Ouyang, Y. Chen, L. Setkova, J. Pawliszyn J. Chromatogr. A 1097 (2005) 9.
- (8) L. Tuduri, V. Desauziers, J.L. Fanlo, J. Microcol. Sep. 12 (2000) 550.
- (9) J. Björklund, P. Tollbäck, C. Hiärne, E. Dyremark, C. Östman, J. Chromatogr. A 1041 (2004) 20.
- (10) Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y. Liu, M.L. Lee, Anal. Chem. 70 (1998) 1866.
- (11) I. Valor, M. Pérez, C. Cortada, D. Apraiz, J.C. Molto, G. Font, J. Sep. Sci. 24 (2001) 39.
- (12) E. Baltussen, S. Pat, D. Frank, H.G. Janssen, C. Cramers, Anal. Chem., 71 (1999) 5213.
- (13) P. Mayer, W.H.J. Vaes, J.L.M. Hermens, Anal. Chem. 72 (2000) 459.
- (14) B. Shurmer, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 72 (2000) 3660.
- (15) R. Doong, S.M. Chan, Anal. Chem. 72 (2000) 3467.
- (16) A.M.C.M. Pijnenburg, J.W. Evets, J. de Boer, J.P. Boon, Reviews of Environ. Contamination and Toxicol. 141 (1995) 1.
- (17) E. Braekevelt, S.A. Titlemier, G.T. Tomy, Chemosphere 51 (2003) 563.
- (18) J. Pawliszyn, Applications of Solid-Phase Microextraction, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- (19) A. Paschke, P. Popp, J. Chromatogr. A 999 (2003) 35.

- (20) J. Dugay, C. Miede, M.C. Hennion, J. Chromatogr. A 795 (1998) 27.
- (21) E.Y. Zeng, D. Tsukada, J.A. Noblet, J. Peng, J. Chromatogr. A 1066 (2005) 165-175.
- (22) J. Hall, M. Satterfield-Doerr, R. Parikh, S. Brodbelt, Anal. Chem., 70 (1998) 1788.
- (23) Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software v8.14 for Solaris (c) 1994-2005  
ACD/Labs



#### IV.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS IGNIFUGOS FENÓLICOS EN MUESTRAS ACUOSAS AMBIENTALES

Como se adelantó en el apartado de Introducción correspondiente a los BFRs (**Apartado II.3**), dentro de esta familia se comercializan algunos compuestos fenólicos como el 2,4-dibromofenol (2,4-DBP), el 2,4,6-tribromofenol (TBP), el pentabromofenol (PBP), el 3,5,3',5'-tetraclorobisfenol A (TCBPA) y el 3,5,3',5'-tetrabromobisfenol A (TBBPA), siendo este último el BFR comercial de mayor volumen de producción a nivel mundial<sup>1</sup>. Además, en la descomposición de materiales plásticos que contengan el TBBPA como aditivo ignífugo, se pueden formar como subproductos otros compuestos fenólicos, como el 2-bromofenol (2-BP), el 2,4-DBP, el 2,6-dibromofenol (2,6-DBP) y el TBP<sup>2</sup>. Por tanto, este grupo de compuestos pueden constituir por sí mismos un problema medioambiental importante.

La mayoría de las investigaciones sobre la presencia de BFRs en muestras ambientales se han enfocado al estudio de los PBDEs<sup>3,4</sup>, tal como se apuntaba en el apartado anterior. Sólo se han publicado un número muy reducido de estudios sobre los BFRs fenólicos<sup>5-7</sup>. Dentro de estos, los procedimientos desarrollados para análisis de aguas se basan principalmente en la extracción de la muestra con disolventes<sup>7-10</sup> o en la SPE<sup>11,12</sup>, seguidas de una determinación tanto por cromatografía líquida<sup>9,11</sup>, como por cromatografía de gases<sup>13,14,15</sup>, aunque en este caso, es necesaria una etapa de derivatización.

En el **Apartado IV.3**, se demostró que la SPME resulta una técnica muy adecuada para la extracción de los PBDEs y los PBBs, por tanto, siguiendo el mismo objetivo, en esta sección de la memoria de Tesis, se decidió implementar un método de determinación de compuestos halogenados fenólicos en muestras de agua, incluyendo la familia de los bromofenoles y los bisfenoles TCBPA y TBBPA, basado en la SPME seguida por GC-MS. Para ello fue necesario introducir una etapa de derivatización *in situ* obteniendo los correspondientes derivados acetilados. Esta técnica se aplicó con éxito en la determinación de otros contaminantes fenólicos como los clorofenoles<sup>16,17</sup>.

Considerando que los clorofenoles pueden ser uno de los principales problemas de contaminación del medio acuático, se decidió investigar la posibilidad de proponer un método para el análisis simultáneo de clorofenoles y bromofenoles en agua.

Todos los resultados obtenidos en estas investigaciones se recogen y discuten detenidamente en los siguientes apartados.

## **IV.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS IGNIFUGOS FENÓLICOS EN MUESTRAS ACUOSAS AMBIENTALES**

<b>IV.5.1 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>259</b>
<i>IV.5.1.1 Patrones y muestras.....</i>	<i>259</i>
<i>IV.5.1.2 Procedimiento de microextracción en fase sólida.....</i>	<i>260</i>
<i>IV.5.1.3 Condiciones instrumentales de medida.....</i>	<i>261</i>
<b>IV.5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>262</b>
<i>IV.5.2.1 Derivatización in situ de los BFRs fenólicos.....</i>	<i>262</i>
<i>IV.5.2.2 Optimización del proceso de microextracción.....</i>	<i>266</i>
<i>IV.5.2.2.1. DISEÑO MULTI-FACTORIAL CATEGÓRICO: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.....</i>	<i>266</i>
<i>IV.5.2.2.2 EVALUACIÓN DE OTROS PARÁMETROS EXPERIMENTALES: Efecto salino, efecto del volumen de las fases, de la agitación y estudio cinético.....</i>	<i>274</i>
<b>IV.5.2.3 CARÁCTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE ACETILACIÓN-IN SITU-HSSPME PROPUESTO.....</b>	<b>278</b>
<i>IV.5.2.3.1 Condiciones experimentales.....</i>	<i>278</i>
<i>IV.5.2.3.2 Linealidad, precisión y LODs.....</i>	<i>278</i>
<i>IV.5.2.3.3 Análisis de muestras reales.....</i>	<i>281</i>
<b>IV.5.2.4 DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS BFRs FENÓLICOS CON OTROS CONTAMINANTES FENÓLICOS.....</b>	<b>282</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>287</b>



### IV.5.1 PARTE EXPERIMENTAL

#### IV.5.1.1 Patrones y muestras

En estas investigaciones se utilizaron patrones de los compuestos 2-bromofenol (2-BP, 98%), 2-bromo-4-metilfenol (2-B-4-MP, 96%), 4-bromo-3-metilfenol (4-B-3-MP, 99%), 2,4-dibromofenol (2,4-DBP, 95%), 2,4,6-tribromofenol (TBP, 99%), pentabromofenol (PBP, 96%), 3,5,3',5'-tetraclorobisfenol A (TCBPA, 98%) y 3,5,3',5'-tetrabromobisfenol A (TBBPA, 97%) suministrados por Aldrich-Chemie (Steinheim, Alemania), y el 2,6-dibromofenol (2,6-DBP, >97%) por Fluka Chemika (Buchs, Suiza).

Por otra parte, los patrones de los compuestos utilizados en el estudio del análisis simultáneo de los bromofenoles con otros compuestos fenólicos, fenol, o-cresol, p-cresol, 2,4-dimetilfenol (2,4-DMP), 2-clorofenol (2-CP), 3-clorofenol (3-CP), 4-clorofenol (4-CP), 4-cloro-3-metilfenol (4-C-3-MP), 2,6-diclorofenol (2,6-DCP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 2,5-diclorofenol (2,5-DCP), 3,5-diclorofenol (3,5-DCP), 2,3-diclorofenol (2,3-DCP), 3,4-diclorofenol (3,4-DCP), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP), 2,3,6-triclorofenol (2,3,6-TCP), 2,3,5-triclorofenol (2,3,5-TCP), 2,4,5-triclorofenol (2,4,5-TCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TeCP) y pentaclorofenol (PCP), se obtuvieron de Aldrich-Chemie.

Otros reactivos, como el anhídrido acético y el bicarbonato potásico ( $\text{KHCO}_3$ , 99.7%), utilizados en la etapa de derivatización, fueron suministrados por Merck (Mollet del Vallés, Barcelona, España) y Aldrich-Chemie, respectivamente.

Partiendo de los patrones comerciales se prepararon disoluciones *stock* individuales en metanol a una concentración de 5000  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de estas disoluciones concentradas se preparó una disolución mezcla de los compuestos incluidos en este trabajo, a nivel de 50  $\mu\text{g/mL}$  en acetona, y a partir de ésta se obtuvieron, por dilución, las disoluciones para realizar adiciones.

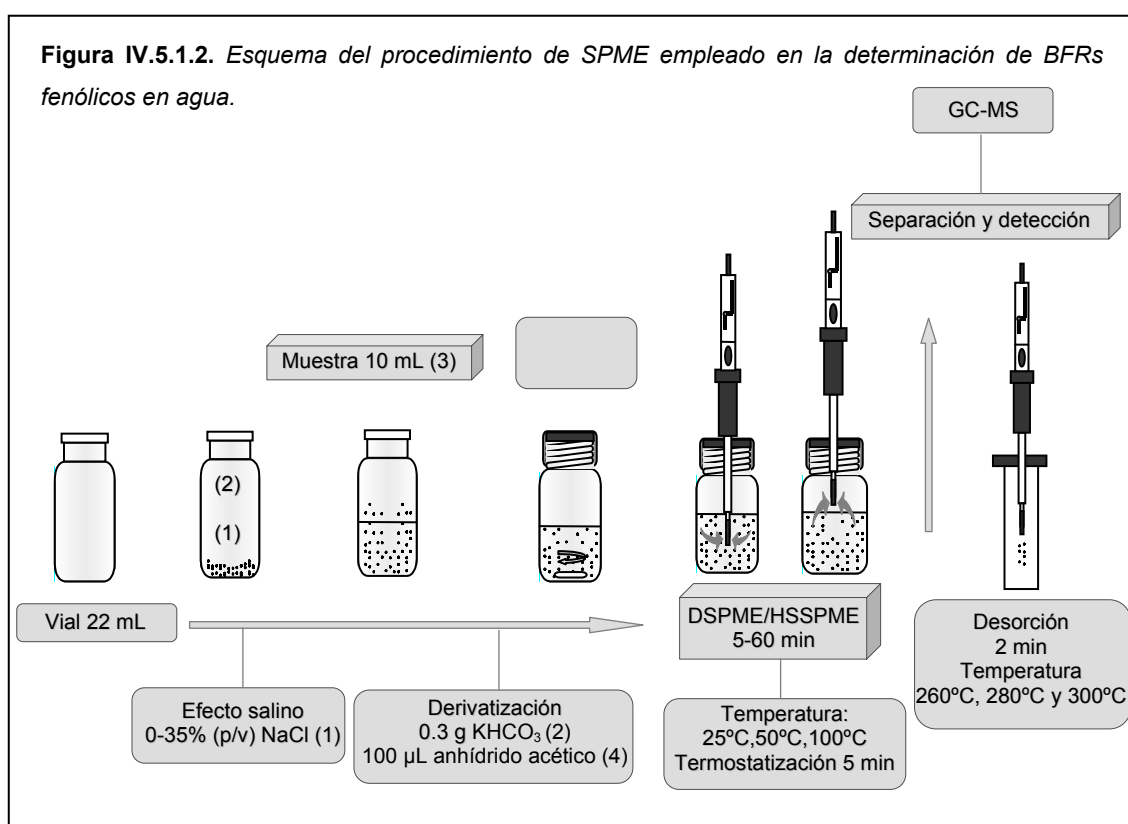
En el estudio también se utilizaron muestras de agua sin adición y con adición, preparadas según se indica en el **Apartado III.3**.

En el proceso de optimización del método y en el estudio de los parámetros analíticos de calidad, se emplearon disoluciones en agua Milli-Q y en los estudios de aplicación del método, se analizaron muestras de agua de grifo tomadas en el propio laboratorio, muestras de agua residual compuestas, correspondientes a un flujo de 12 horas, tomadas en la entrada y la

salida de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas (Santiago de Compostela), y de colectores urbanos situado en la misma ciudad. Antes de su análisis, las muestras de agua residual, se filtraron con filtros de fibra de vidrio de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

#### IV.5.1.2 Procedimiento de microextracción en fase sólida

La extracción y concentración de los compuestos fenólicos halogenados estudiados en las muestras de agua, se realizó siguiendo el esquema que aparece en la **Figura IV.5.1.2**.



En primer lugar, antes de añadir la disolución de trabajo a los viales (22 mL de capacidad), se pesaron en éstos cantidades variables de NaCl entre 0 y 3.5 g, según la investigación a realizar, y 0.3 g de  $\text{KHCO}_3$ . A continuación se adicionaron alícuotas de 10 mL de la disolución de trabajo y 100  $\mu\text{L}$  de anhídrido acético, procediéndose al cierre de los viales con cápsulas de aluminio y septa con la cara interior recubierta de PTFE. En las pruebas en las que se necesitó la aplicación de agitación magnética, se introdujeron barras magnéticas y, a continuación, se sellaron los viales.

Antes de la extracción, el vial con la muestra se mantuvo en un baño de agua a temperatura controlada durante 5 min, para conseguir la temperatura indicada por el experimento (25, 50 o 100°C). Una vez perforado el septum con una aguja e introducida la guía del dispositivo de SPME, se expuso la fibra al espacio de cabeza sobre la muestra (HSSPME) o directamente a la misma (DSPME).

En este estudio se consideraron cinco fibras comerciales, que cubren el espectro completo de posibilidades en cuanto a polaridad del recubrimiento, y que incluyen la fibra de 85 µm de poliacrilato (PA), la de 100 µm de polidimetilsiloxano (PDMS), la de 75 µm de Carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), la de 65 µm de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) y la de 65 µm de Carbowax-divinilbenceno (CW-DVB).

Una vez finalizado el periodo de extracción, 30 minutos, excepto en el estudio cinético (de 5 a 60 min), la fibra se retrajo, retirándola de forma segura en el soporte, el cual se insertó en el inyector del cromatógrafo de gases para llevar a cabo el análisis cromatográfico. La desorción se realizó durante 2 min, coincidiendo con el tiempo de purga marcado en el programa cromatográfico, a la temperatura máxima recomendada para la fibra en cuestión por el fabricante: 260°C para la fibra de CW-DVB, 280°C para PDMS y PDMS-DVB y 300°C para PA y CAR-PDMS.

Para evitar posibles efectos de memoria en las fibras, se prolongó el tiempo de desorción durante cinco minutos más, ya con la válvula de purga abierta en el inyector.

Además, se chequearon blancos periódicamente para confirmar la ausencia de contaminación durante los análisis.

#### IV.5.1.3 Condiciones instrumentales de medida

Para el análisis mediante GC-MS, se contó con un cromatógrafo de gases modelo Varian® 3800 (Varian Chromatography System, Walnut Creek, CA), provisto de un inyector split/splitless, trabajando en el modo splitless y acoplado a un detector de masas modelo Varian® Saturn 2000 GC-MS, con trampa de iones operando en ionización electrónica (EI). El control del equipo y el procesamiento de la señal se llevó a cabo con el programa informático Varian® Saturn GC-MS, versión 5.4<sup>18</sup>. Las condiciones instrumentales utilizadas se recogen en la **Tabla IV.5.1.3**.

Tabla IV.5.1.3. Condiciones instrumentales de GC-MS.

Varian® 3800 (GC)	
Columna	CPSil8 CB low-bleed MS ((5% fenil, 95% dimetil)-polisiloxano)
Dimensiones	25mx0.25mmx0.25µm
Gas portador	He (99.999% de pureza)
Tipo de inyector	Split/splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	2 min
Tª del inyector	de 260°C a 300°C según el tipo de fibra
Relación de split	50
Flujo en columna (He)	1 mL/min (constante)
Tª de la línea de transferencia	300°C
Programa de Temperaturas	
• Primer Gradiente	
Tª inicial	90°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de temperatura	10°C/min
Tª final	300°C
Tiempo final	6 min
Tiempo total del análisis	28 min
Varian® Saturn 2000 (MSD)	
Modo de ionización	El (ionización electrónica), 70 eV
Voltaje del multiplicador	1800 V
Voltaje de modulación axial	4 V
Tª de la trampa de iones	250°C
Tª del manifold	50°C
Rango de masas	90-650 m/z
Velocidad de escaneado	1 s/scan
Corriente de emisión del filamento	15 µA

## IV.5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.5.2.1 Derivatización in situ de los BFRs fenólicos

Cuando los fenoles se analizan directamente mediante GC, tienden a proporcionar picos anchos y con cola, debido a su capacidad de unirse a la fase estacionaria de las columnas cromatográficas mediante un enlace con el hidrógeno del grupo alcohol. Esto hace necesario la introducción de una etapa de derivatización para transformar los fenoles en compuestos menos polares<sup>19</sup>

Se han aplicado diferentes procedimientos de derivatización para mejorar la separación cromatográfica de fenoles halogenados, como la metilación mediante dimetilsulfato o diazometano, o la esterificación mediante anhídrido acético o bromuro de pentafluorobencilo (PFBB)<sup>20</sup>.

La acetilación mediante anhídrido acético en presencia de una sal de bicarbonato como tampón es una de las reacciones de derivatización más estudiadas de las aplicadas al análisis de fenoles<sup>17,21</sup>. La reacción puede producirse en medio acuoso eficazmente, en pocos minutos y empleando reactivos de bajo coste<sup>22</sup>.

La reacción de acetilación *in situ* seguida de la microextracción ha sido aplicada con éxito en el análisis de diferentes contaminantes fenólicos tanto en muestras de agua como en muestras sólidas<sup>16,23</sup>.

Siguiendo esta línea, se decidió estudiar la adecuación del procedimiento de acetilación-*in situ*-SPME en el análisis de los ignífugos considerados. Para ello, se llevó a cabo la extracción de muestras de agua con adición de los compuestos a un nivel de ng/mL, después de la adición de NaCl (35% p/v) y los reactivos necesarios para la acetilación (0.3 g de bicarbonato de potasio y 100 µL de anhídrido acético), durante 30 minutos y usando una fibra de 100 µm de PDMS. De los resultados obtenidos se concluye que la técnica es viable para el análisis de BFRs fenólicos y que empleando las condiciones cromatográficas de la **Tabla IV.5.1.3** se consigue una buena resolución de los compuestos.

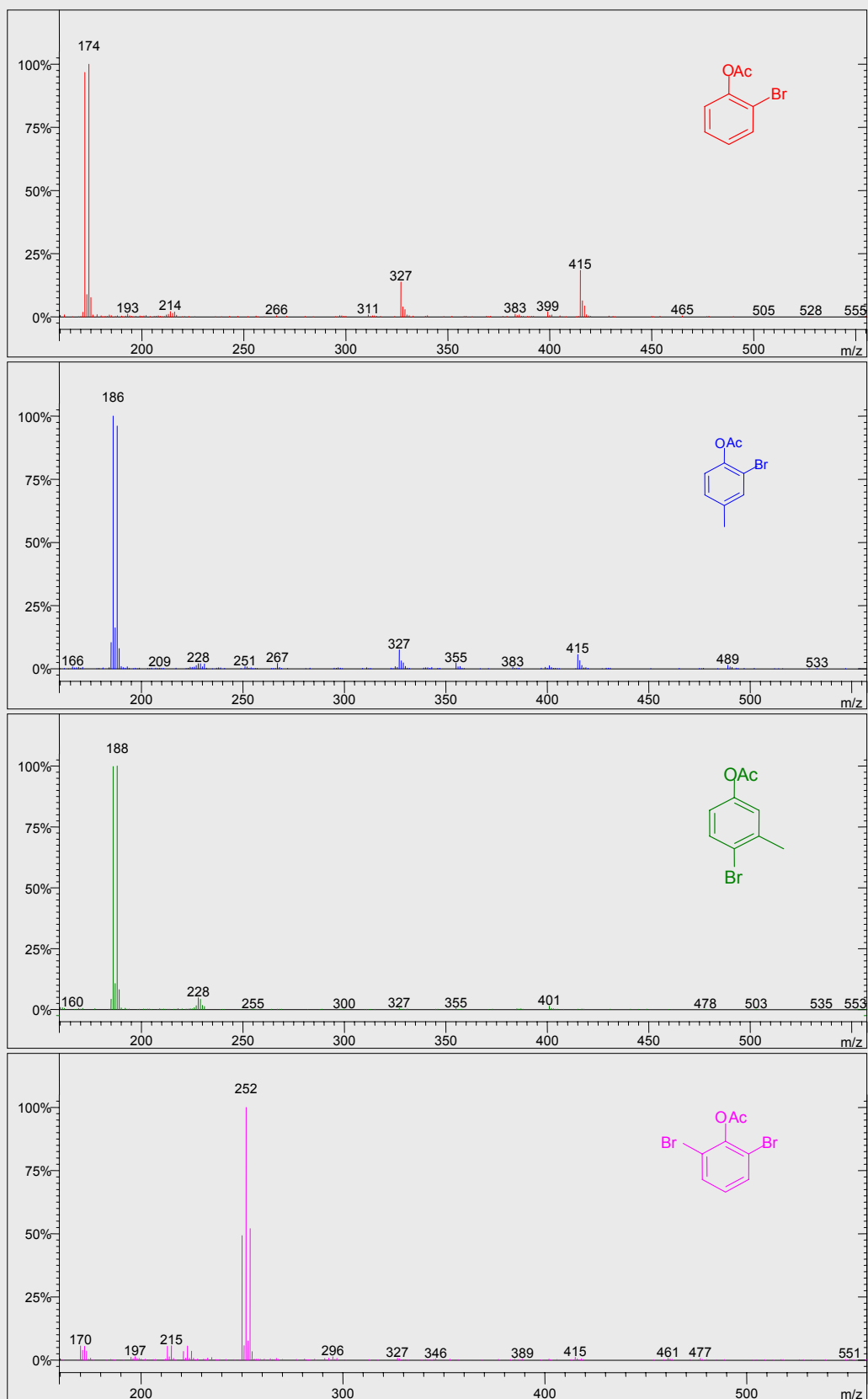
En la **Tabla IV.5.2.1** se muestran los tiempos de retención ( $t_r$ ), bajo las condiciones cromatográficas recogidas en la **Tabla IV.5.1.3**, así como, los iones característicos de los espectros de masas correspondientes a los derivados acetilados obtenidos.

**Tabla IV.5.2.1** *Tiempos de retención, iones de cuantificación e iones de identificación de los derivados acetilados de los compuestos bromados estudiados.*

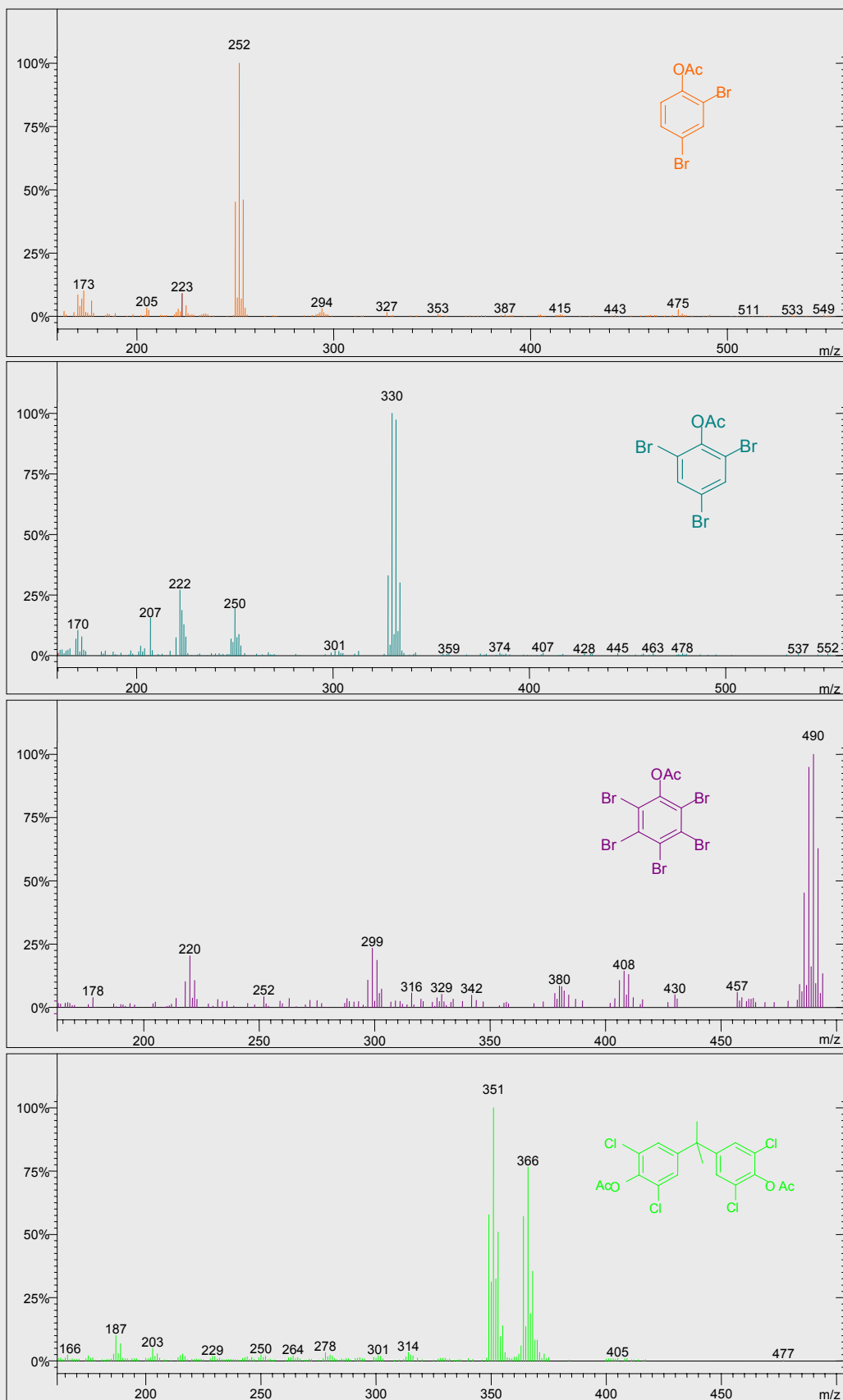
Compuesto	$t_r$ (min)	iones de identificación	iones de cuantificación
2-BP	7.15	172:174, 214:216	172+174
2-B-4-MP	8.58	186:188, 228:230	186+188
4-B-3-MP	9.11	186:188, 228:230	186+188
2,6-DBP	10.03	250: 254, 294:296	250+252+254
2,4-DBP	10.44	250:254, 294:296	250+252+254
2,4,6-TBP	12.83	328:334, 374	328+330+332+334
PBP	19.58	486:492, 533	486+488+490
TCBPA	22.44	349:353, 438:450	349+351+353
TBBPA	26.39	527:531, 542:546	527+529+531

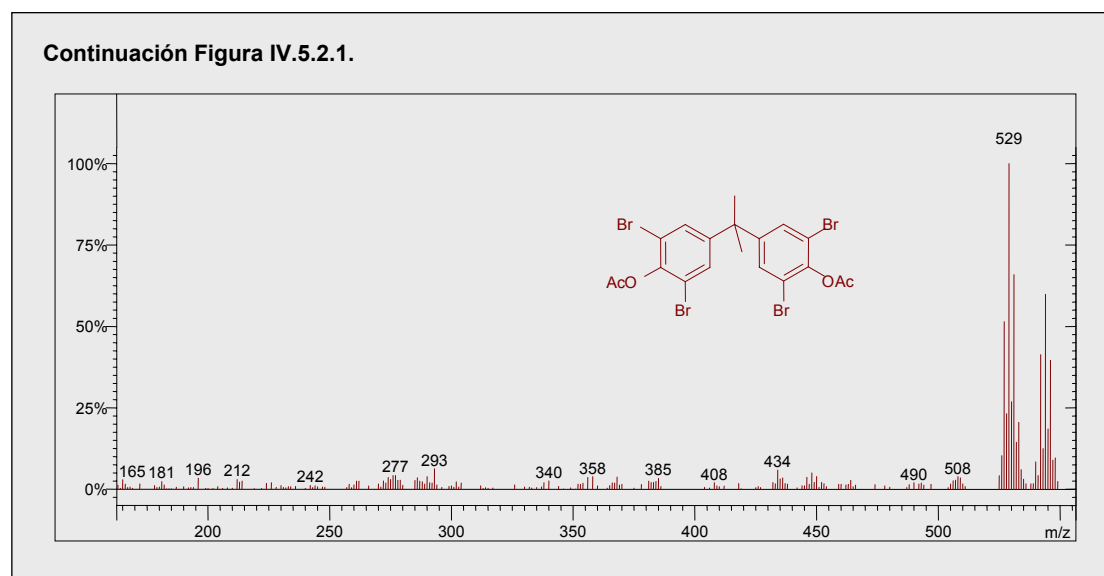
Para la elección de los iones característicos más adecuados para la cuantificación de cada especie, se tuvo en cuenta la mejor relación señal/ruido obtenida para cada suma de iones.

**Figura IV.5.2.1.** Espectros de masas de los derivados acetilados los compuestos ignífugos bromados considerados en este estudio.



Continuación Figura IV.5.2.1.





Los iones de cuantificación se corresponden con los iones del cluster base de los espectros de masas (ver **Figura IV.5.2.1**). En el caso de los derivados acetilados de los bromofenoles, los espectros de masas presentan como cluster base el correspondiente a la pérdida del grupo acetilo, mientras que para los bisfenoles halogenados, se corresponde con la pérdida de los grupos acetilo y un grupo metilo. En cuanto a los isómeros, estos se identificaron mediante el tiempo de retención obtenido en el análisis de los compuestos por separado.

#### IV.5.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROEXTRACCIÓN

##### IV.6.2.2.1. DISEÑO MULTI-FACTORIAL CATEGÓRICO: Estudio del tipo de fibra, de la temperatura de extracción y del modo de muestreo.

Una vez confirmada la posibilidad de llevar a cabo la derivatización-*in situ*-SPME de los compuestos seleccionados, se realizó el estudio de los parámetros más influyentes en el proceso de extracción. Para ello se seleccionó un diseño multifactorial categórico, el cual permite evaluar un mayor número de niveles de los factores considerados. En este caso, se incluyó en el diseño, el tipo de fibra, pudiendo considerar cinco fibras comerciales (PA de 85  $\mu\text{m}$ , PDMS de 100  $\mu\text{m}$ , CW/DVB de 65  $\mu\text{m}$ , CAR/PDMS de 75  $\mu\text{m}$  y PDMS/DVB de 65  $\mu\text{m}$ ), la temperatura de extracción, estudiada a tres niveles (25, 50 y 100°C) y el modo de muestreo (DSMPE y HSSPME).



El diseño seleccionado  $5 \times 3 \times 2$ , se trata de un diseño de resolución tipo  $V^{24}$ , lo que permite, tal como se explicaba en el capítulo de Introducción, evaluar los efectos principales, así como, las interacciones entre factores, que en muchas ocasiones pueden ofrecer información relevante a la hora de la puesta punto del método de microextracción. Además, dispone de ocho grados de libertad para evaluar el error experimental, lo que proporciona estimaciones certeras de los resultados.

La selección de los valores del resto de factores, que se mantuvieron constantes durante las experiencias marcadas por el diseño, se basó en diferentes consideraciones. El tiempo de extracción se seleccionó de forma que se consiguiese el máximo rendimiento teniendo en cuenta el tiempo necesario para el análisis cromatográfico (ver **Tabla IV.6.1.3**), por lo que se determinó un tiempo de extracción de 30 minutos.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la adición de sal puede favorecer el paso de los analitos orgánicos de la matriz de la muestra hacia la fibra, se decidió adicionar a la muestra NaCl al 35% p/v. Además, se utilizó agitación magnética para acelerar la transferencia de masa en el medio acuoso.

Tal como se recoge en el **Apartado II.5.1**, el diseño realizado permite estudiar los resultados obtenidos tras la realización de las 30 experiencias que propone, mediante diferentes tests estadísticos y opciones gráficas. La finalidad es obtener los factores que presentan un efecto significativo para cada compuesto, de la manera más sencilla posible y la robustez estadística necesaria.

Una de estas opciones es el ANOVA, que ya se presentó en el estudio de aplicación de la SPME al análisis de fragancias sintéticas (ver **Apartado IV.1.2.2**). El ANOVA permite identificar los factores significativos mediante la estimación de los valores de la constante F para cada factor e interacción. En la **Tabla IV.5.2.2.1.1** se recogen los valores de F así como los valores de p, para cada compuesto. El valor de F nos da una idea de la contribución de cada factor o interacción a la varianza de la respuesta para cada compuesto, y el valor de p prueba la significación estadística de estos efectos.

Los factores o interacciones que presentan valores de p menores de 0.05 (señalados en negrita), se consideran estadísticamente significativos. Así, podemos comprobar como la temperatura de extracción (B) presentó un efecto significativo para todos los compuestos, excepto para el PBP y los bisfenoles, y como el modo de extracción (C), así como su interacción con la temperatura (BC), también fueron factores significativos en la extracción de varios compuestos. El tipo de fibra (A), por su parte, mostró un efecto significativo en la extracción de los compuestos 2-BP, 2-B-4-MP, PBP y TBBPA. Para este último, también fue significativa la interacción entre la fibra y el modo de muestreo (AC).

**Tabla IV.5.2.2.1.1.** Resultados del ANOVA para los nueve compuestos fenólicos estudiados, mostrando la significación estadística de los factores principales y sus interacciones.

Compuesto	Valores	Efectos principales			Interacciones		
		A: Fibra	B: Temperatura	C: Modo de extracción	AB	AC	BC
2-BP	F	15.0	4.77	2.64	3.31	0.64	1.89
	p	<b>0.00</b>	<b>0.04</b>	0.14	0.06	0.65	0.21
2-B-4-MP	F	5.25	5.24	16.4	2.16	0.67	2.75
	p	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>	<b>0.01</b>	0.15	0.63	0.12
4-B-3-MP	F	2.70	6.98	16.2	1.83	0.68	4.43
	p	0.11	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	0.20	0.62	<b>0.05</b>
2,6-DBP	F	2.85	17.3	9.52	2.29	0.51	9.17
	p	0.10	<b>0.00</b>	<b>0.02</b>	0.13	0.73	<b>0.01</b>
2,4-DBP	F	0.60	2.09	2.50	1.18	0.87	2.97
	p	0.67	0.19	0.15	0.41	0.52	0.11
2,4,6-TBP	F	1.57	6.27	11.2	0.95	0.80	4.49
	p	0.27	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	0.53	0.56	<b>0.05</b>
PBP	F	5.25	2.66	0.14	1.26	0.19	2.44
	p	<b>0.02</b>	0.13	0.72	0.38	0.93	0.15
TCBPA	F	3.27	3.66	1.07	0.55	0.14	5.93
	p	0.07	0.07	0.33	0.79	0.96	<b>0.03</b>
TBBPA	F	9.93	1.41	9.67	0.26	3.85	3.89
	p	<b>0.00</b>	0.30	<b>0.01</b>	0.96	<b>0.04</b>	0.07

Para obtener información más detallada sobre como ejercen su influencia los factores que resultaron significativos en el estudio de ANOVA, es necesario recurrir a las gráficas de interacciones entre factores.

Estas representaciones reflejan la evaluación de un determinado factor respecto a las variaciones de otro, evidenciando qué niveles proporcionan una mayor respuesta y si existe interacción entre ellos.

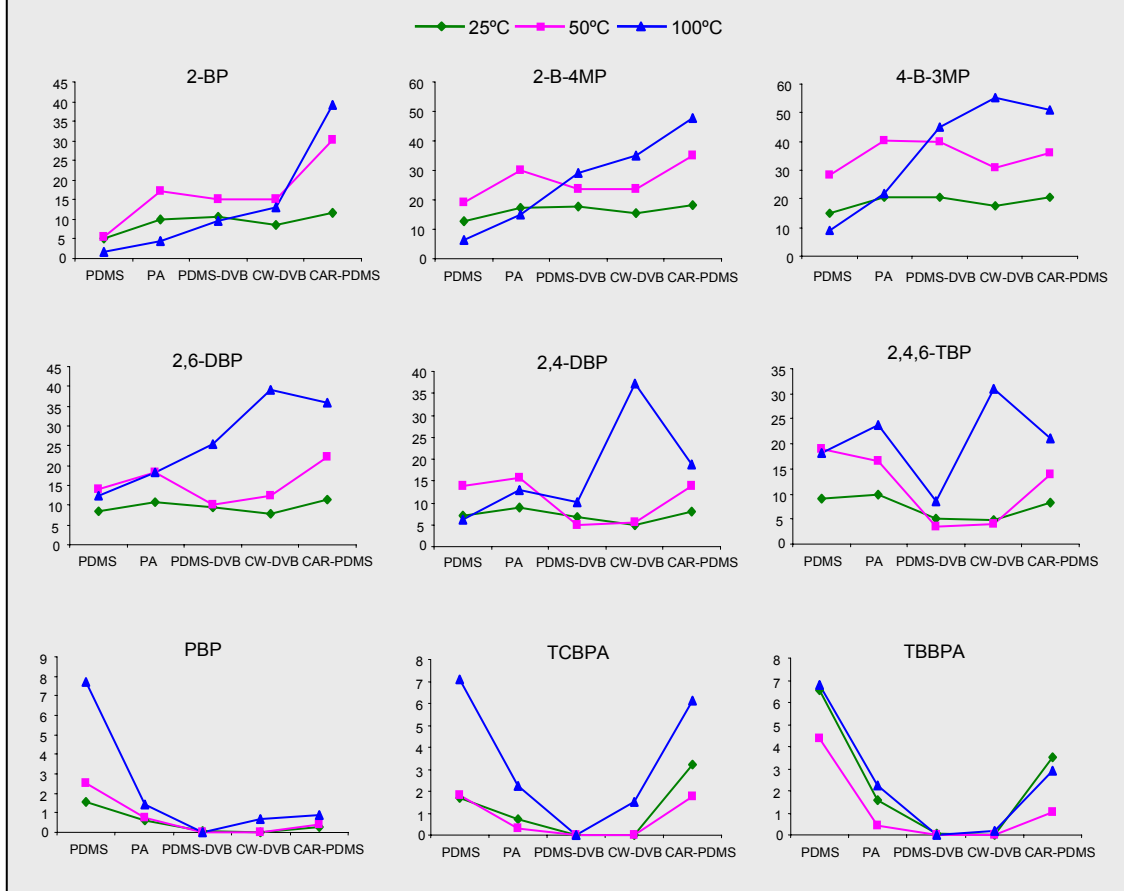
En la **Figura IV.6.2.2.1.1** se muestra la influencia de los factores tipo de fibra y temperatura de muestreo en la extracción de los nueve BFRs objeto de estudio.

Como puede observarse en los gráficos, para la mayoría de los compuestos las diferencias entre las respuestas obtenidas con cada una de las fibras a 25 y 60°C son menos importantes que a 100°C, y en general, es con esta temperatura de trabajo con la que se consiguen mejores eficacias de extracción.

En cuanto al tipo de recubrimiento, CAR-PDMS y PDMS-DVB son las fibras que proporcionan una mayor respuesta en el análisis de los compuestos con menor grado de bromación (2-BP, 2-B-4MP, 4-B-3-MP, 2,6-DBP y 2,4-DBP) a 100°C. En el caso del TBP, las respuestas con todas las fibras (excepto PDMS-DVB) son bastante similares, por lo que puede decirse que cualquiera de estas fibras resultaría adecuada para el análisis de este compuesto.

Ya para los compuestos más bromados, PBP y TBPA, la fibra de PDMS es la que resulta más eficaz.

**Figura IV.5.2.2.1.1** Gráficas de interacción fibra-temperatura de extracción para los nueve compuestos estudiados (resultados expresados en cuentas de área,  $\times 10000$ ).



Por último, para el TCBPA, es importante resaltar como las fibras de PDMS y CAR-PDMS son las más eficaces y con respuestas prácticamente comparables. En este sentido, cabe señalar que el peso molecular de este compuesto, al tratarse de un compuesto clorado, es inferior al del PBP y el TBBPA y muy próximo al del TBP; y que en general, parece apreciarse una relación entre el peso molecular de los compuestos y la eficacia de extracción para la fibra de CAR-PDMS.

En este tipo de recubrimiento, compuesto por partículas porosas embebidas en un polímero líquido, el mecanismo de extracción viene determinado por la adsorción de los analitos en la superficie de las partículas, mientras que para la fibra de PDMS (polímero homogéneo) predomina el mecanismo de difusión hacia el interior de la fibra, es decir, el mecanismo de absorción. En este sentido, los compuestos de menor tamaño pueden ser retenidos en los poros del material polimérico en función de su tamaño y los compuestos de mayor tamaño podrían extraerse mejor por difusión en una fase pura<sup>25</sup>.

La relación entre el tamaño molecular y la eficacia de extracción de la fibra CAR-PDMS se pudo constatar también en el análisis de ftalatos (ver Apartado **IV.2.2.2.1**, **Figura IV.2.2.2.1.1**).

Como ya se comentó, la temperatura fue un factor significativo para la mayoría de los compuestos, y con la información obtenida en la **Figura IV.5.2.2.1.1**, parece que 100°C es la temperatura de extracción más adecuada. Sin embargo, también se había comprobado cómo la interacción entre este factor y el modo de muestreo resultaba significativa para ciertos compuestos (ver **Tabla IV.5.2.2.1.1**).

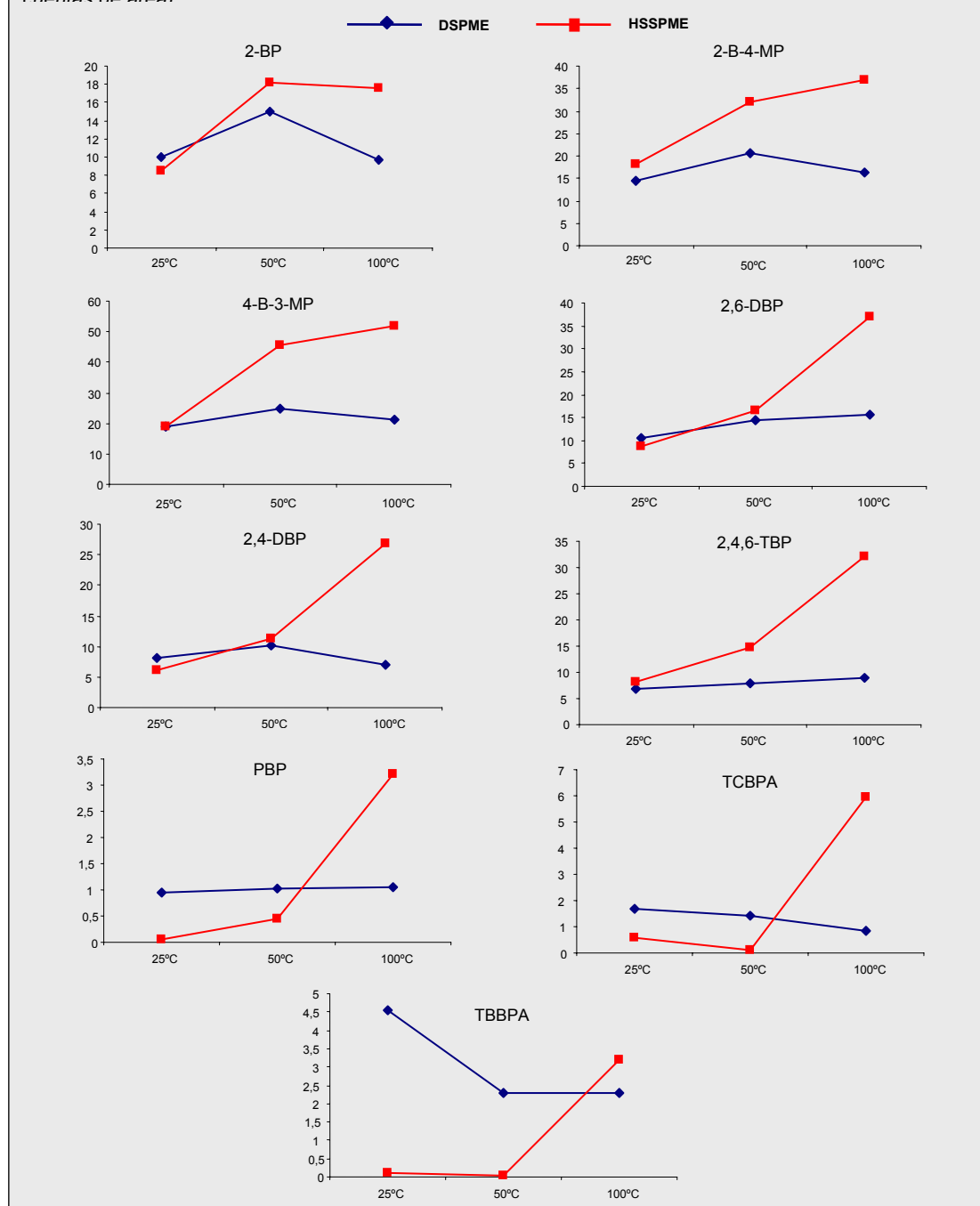
En la **Figura IV.5.2.2.1.2** se muestran las gráficas de interacción entre los factores temperatura-modo de muestreo. Confirmando los resultados del ANOVA, se observa una interacción importante para varios de los compuestos estudiados.

En general, el modo HSSPME presentó mejores respuestas a temperaturas altas mientras que a temperatura ambiente resultó más eficaz el muestreo directo.

Por otra parte, el efecto de la temperatura fue mayor sobre la respuesta de HSSPME, sobre todo para los compuestos más pesados, PBP, TCBPA y TBBPA, apreciándose un considerable incremento en la eficacia de extracción a 100°C. De hecho, para la mayoría de los compuestos estas fueron las mejores condiciones de extracción (HSSPME a 100°C).

Para DSPME, sin embargo, el aumento de la temperatura no mostró un efecto significativo, excepto para el TBBPA. Para este compuesto, las mejores condiciones de extracción se obtienen por DSPME a 25°C, pero, teniendo en cuenta el descenso que se produce en la respuesta por DSPME al aumentar la temperatura, mientras la eficacia mejora para HSSPME, la respuesta bajo estas condiciones sólo es un 30% más baja que trabajando en las condiciones óptimas.

**Figura IV.5.2.1.2.** Gráficas mostrando el efecto combinado de los factores temperatura de extracción y modo de muestreo para los compuestos fenólicos incluidos en este estudio (respuestas expresadas en cuentas de área)



El hecho de que compuestos de elevado peso molecular, como los BFRs incluidos en este estudio, se extraigan de manera efectiva mediante HSSPME, es un fenómeno que ya se observó para otros compuestos incluidos en esta memoria de Tesis como los PBDEs y PBBs<sup>26</sup>, y previamente, también se encontró para otros compuestos clorados como los PCBs<sup>27,28</sup>.

Si tenemos en cuenta las bajas presiones de vapor y valores de H que presentan estos compuestos<sup>29</sup>, sería poco probable que, en condiciones normales, los compuestos pasasen al HS. La explicación podría encontrarse en las condiciones que se alcanzan en el interior del vial de extracción a altas temperaturas, que podrían favorecer la volatilización de los analitos, es decir, la transferencia de masa desde la muestra hasta al HS y por tanto acelerar la cinética de extracción.

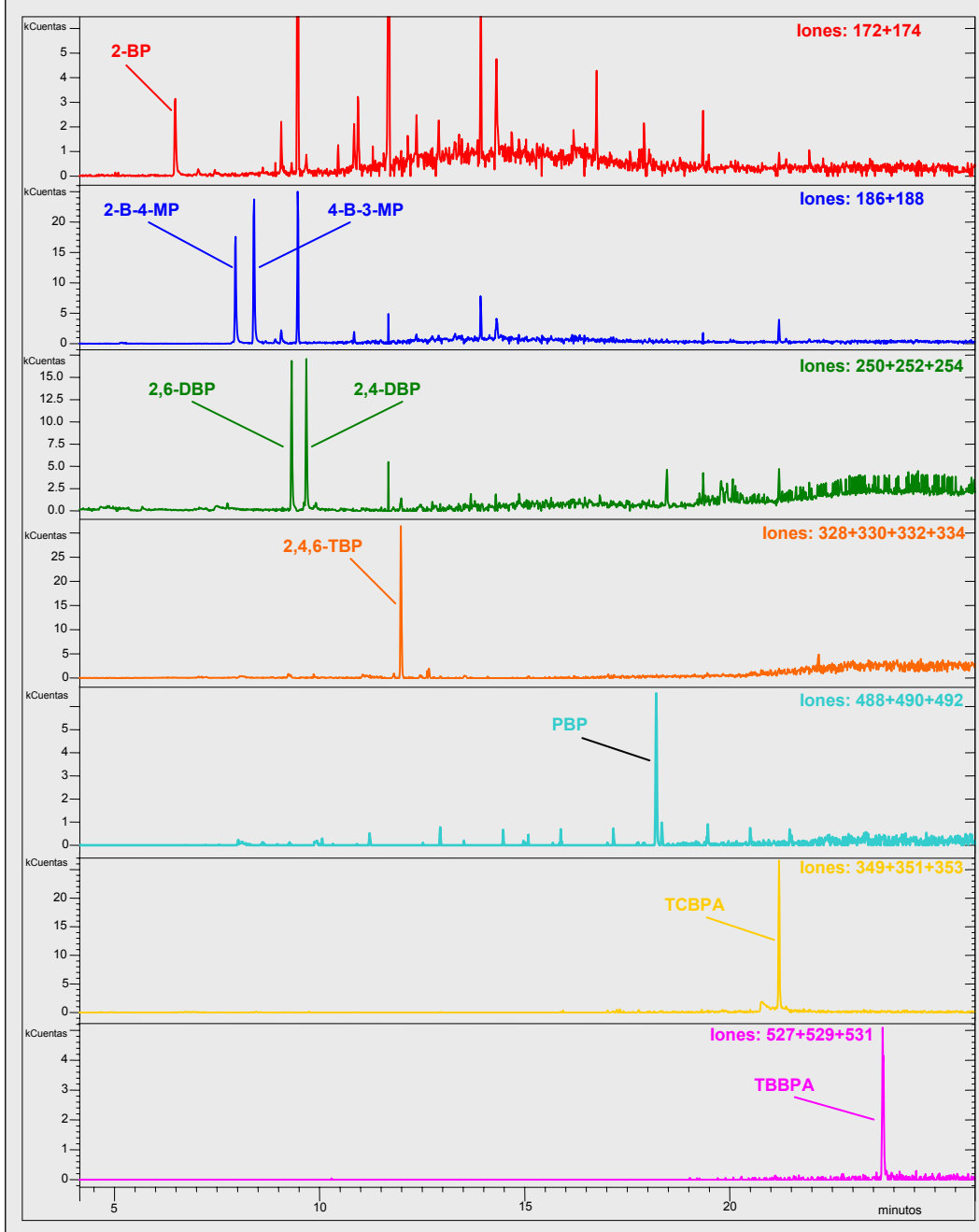
Por último, se evaluó la interacción entre el tipo de fibra y el modo de muestreo; sin embargo, el estudio de los gráficos no aportó información adicional sobre el proceso de microextracción de los BFRs fenólicos, por lo que no se incluyen en la presente memoria.

Tras el análisis de toda la información obtenida del diseño experimental, se llega a la conclusión de que las condiciones óptimas de extracción para cada compuesto son bastante similares. Así, considerando el análisis simultáneo de los nueve compuestos, se seleccionó 100°C como temperatura de extracción, y HSSPME como modo de muestreo. Además, como ya se comentó, aunque para el TBBPA el modo de muestreo óptimo fue DSPME, las respuestas obtenidas con las condiciones generales consideradas fueron sólo un 30% inferiores, siendo también adecuadas para el análisis de este compuesto las condiciones generales.

En cuanto al tipo de fibra, se decidió continuar el estudio con la fibra de CAR-PDMS ya que, en general, fue la que presentó las mejores eficacias de extracción; sin embargo, también se incluyó la fibra de PDMS, considerando su mejor respuesta para PBP, TCBPA y TBBPA. La fibra de CW-PDMS se descartó, aunque resultó la fibra más eficiente para algunos compuestos, porque sus respuestas fueron muy bajas para PBP, TCBPA y TBBPA. Además esta fibra presentó otros problemas, como un tiempo de vida corto, problema encontrado por otros autores al usar este tipo de fibra<sup>30,31</sup>.

En la **Figura IV.5.2.2.1.3** se muestra el cromatograma de iones de los derivados acetilados de los compuestos estudiados, extraídos bajo las condiciones óptimas dadas por el diseño.

**Figura IV.5.2.2.1.3.** Cromatograma de masas de una muestra de agua Milli-Q con una concentración de 1 ng/mL tras la acetilación- *in situ*-SPME (PDMS, HSSPME, 100°C).



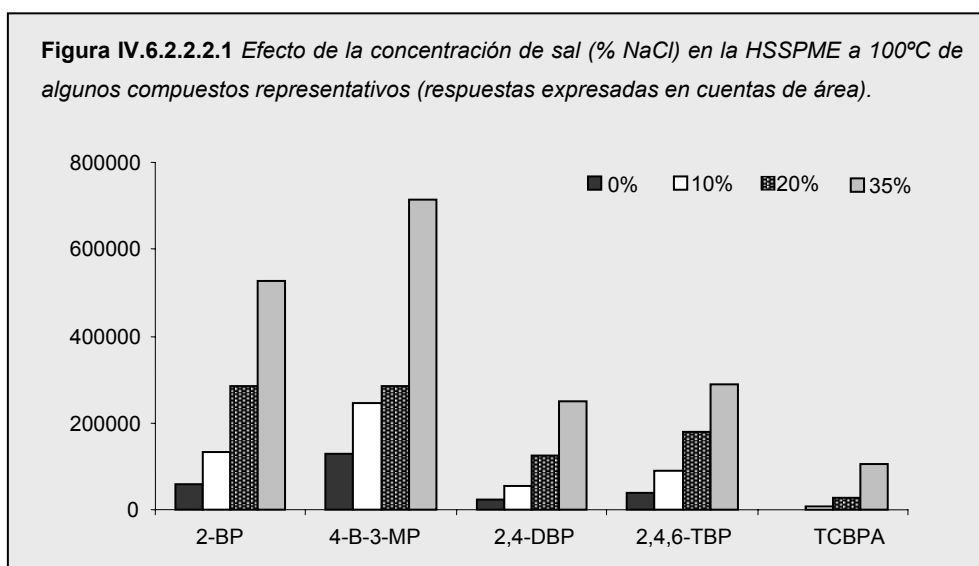
#### IV.5.2.2.2 EVALUACIÓN DE OTROS PARÁMETROS EXPERIMENTALES: Efecto salino, efecto del volumen de las fases, de la agitación y estudio cinético.

Como se indicaba en el apartado anterior, la adición de sal no se incluyó inicialmente en el diseño.

El hecho de añadir sal a la muestra provoca un incremento de la fuerza iónica de la disolución acuosa, por lo que puede disminuir la solubilidad de los compuestos orgánicos en esta fase y favorecer su desplazamiento hacia el HS o hacia la fibra<sup>25</sup> (ver en el capítulo de Introducción el **apartado II.4.3.2**).

Con el fin de evaluar este posible efecto positivo de la adición de sal en la extracción de los BFRs fenólicos, se realizaron extracciones de muestras acuosas con diferentes concentraciones de sal, desde 0 hasta 35% peso/volumen de NaCl. Las condiciones de extracción que se emplearon fueron, el muestreo del HS con CAR-PDMS a 100°C, de 10 mL de muestra en viales de 22 mL.

El incremento de la respuesta con el contenido de sal en la muestra se ilustra en la **Figura IV.5.2.2.2.1** para algunos compuestos representativos del comportamiento general. Con este estudio, se concluye que la adición de sal es un factor importante para alcanzar mejores eficacias de extracción para todos los compuestos.



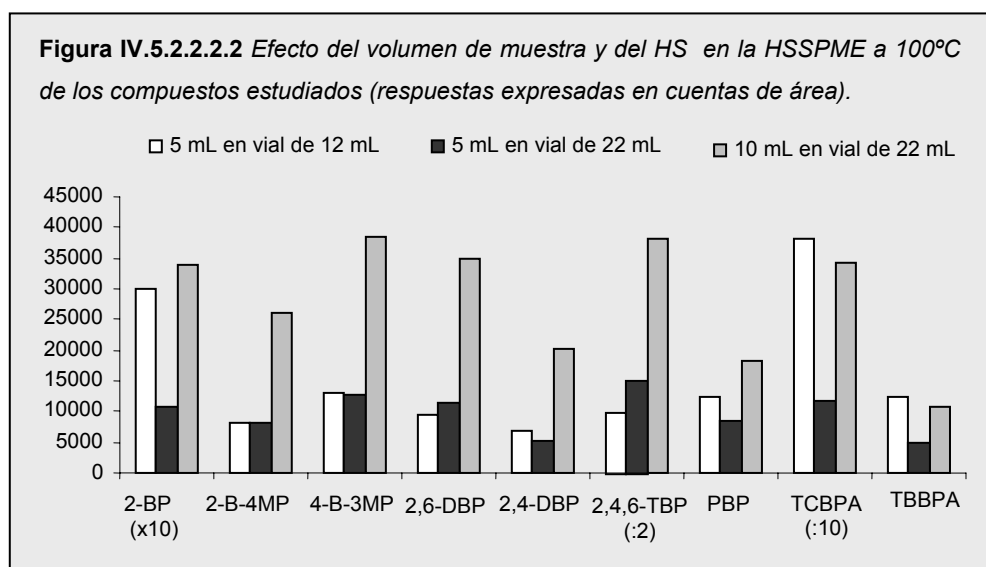
El efecto del volumen de las fases implicadas en el proceso de extracción tampoco se consideró en el diseño.



Sin embargo, la relación de volúmenes entre fases para el proceso de HSSPME puede tener relevancia a la hora de seleccionar las mejores condiciones.

Para investigar el efecto del volumen de fases en la HSSPME de los BFRs fenólicos, se realizaron extracciones con la fibra de PDMS a 100°C de alícuotas de 5 mL de muestra en viales de 12 (7 mL de capacidad para el HS) y 22 mL (17 mL de HS), y de alícuotas de 10 mL en viales de 22 mL (12 mL de HS).

Los resultados obtenidos en estas pruebas se muestran en la **Figura IV.5.2.2.2.2**.



Considerando sólo los aspectos termodinámicos, el incremento del volumen del espacio de cabeza debería disminuir la respuesta, si la capacidad de esta fase es importante, o no afectar a la respuesta, si la capacidad de esta fase es despreciable.

Si comparamos las dos primeras barras de la Figura, las cuales representan el mismo volumen de muestra pero distinto espacio de cabeza, vemos como para la mayoría de los compuestos el volumen de HS no presenta un efecto significativo en la respuesta, excepto para el 2-BP y los bisfenoles. Para estos compuestos al aumentar el volumen de HS, la respuesta disminuye de manera importante.

Por otra parte, la sensibilidad del proceso de SPME es proporcional a la cantidad de analito en la muestra, por lo que es de esperar que al aumentar el volumen de muestra aumente la respuesta. Si comparamos, la primera y última barra de la Figura, vemos que manteniendo más o menos constante el volumen de HS, pero aumentando el volumen de muestra de 5 a 10 mL, las respuestas aumentan para la mayoría de los compuestos, con la excepción otra vez del el 2-BP y los bisfenoles, para los cuales las respuestas son prácticamente iguales.

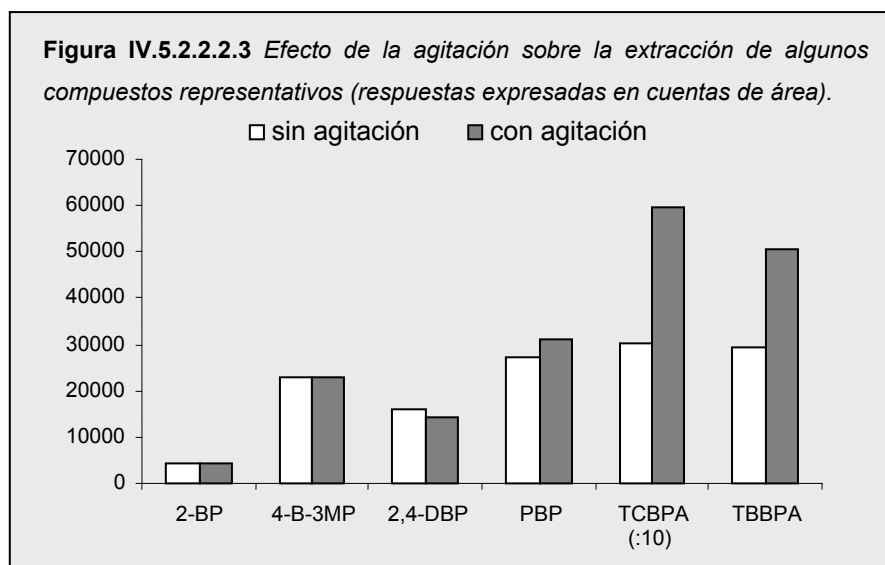
A la vista de los resultados, se decidió seguir trabajando con alícuotas de 10 mL en viales de 22 mL.

Este efecto del volumen de las fases resulta difícil de explicar, ya que depende directamente de las constantes de distribución de los analitos entre las distintas fases que componen el sistema, sobre los que influyen tanto aspectos termodinámicos como aspectos cinéticos, si nos encontramos bajo condiciones de no equilibrio.

Por otra parte, la agitación magnética de la muestra se consideró inicialmente en el diseño como un factor constante para favorecer la difusión del analito entre las fases, incluyendo el paso, tanto de la muestra acuosa hacia la fibra, como de la muestra al espacio de cabeza. La aceleración de la transferencia de masa entre las fases, disminuye el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, pero no afecta a la extracción si los compuestos se encuentran bajo condiciones de equilibrio<sup>25</sup>.

Para confirmar el efecto de la agitación sobre la extracción de los nueve compuestos fenólicos estudiados mediante HSSPME, se realizaron una serie de experiencias sin y con aplicación de agitación mediante el muestreo durante 30 min a 100°C con la fibra de PDMS.

En la **Figura IV.5.2.2.2.3** se representan los resultados obtenidos en estas pruebas.



A partir de los resultados, se llega a la conclusión de que la agitación sólo presenta un efecto significativamente positivo en la extracción de los bisfenoles. Por tanto, para favorecer la extracción de estos dos compuestos se decidió aplicar agitación a las muestras en el resto de experiencias.

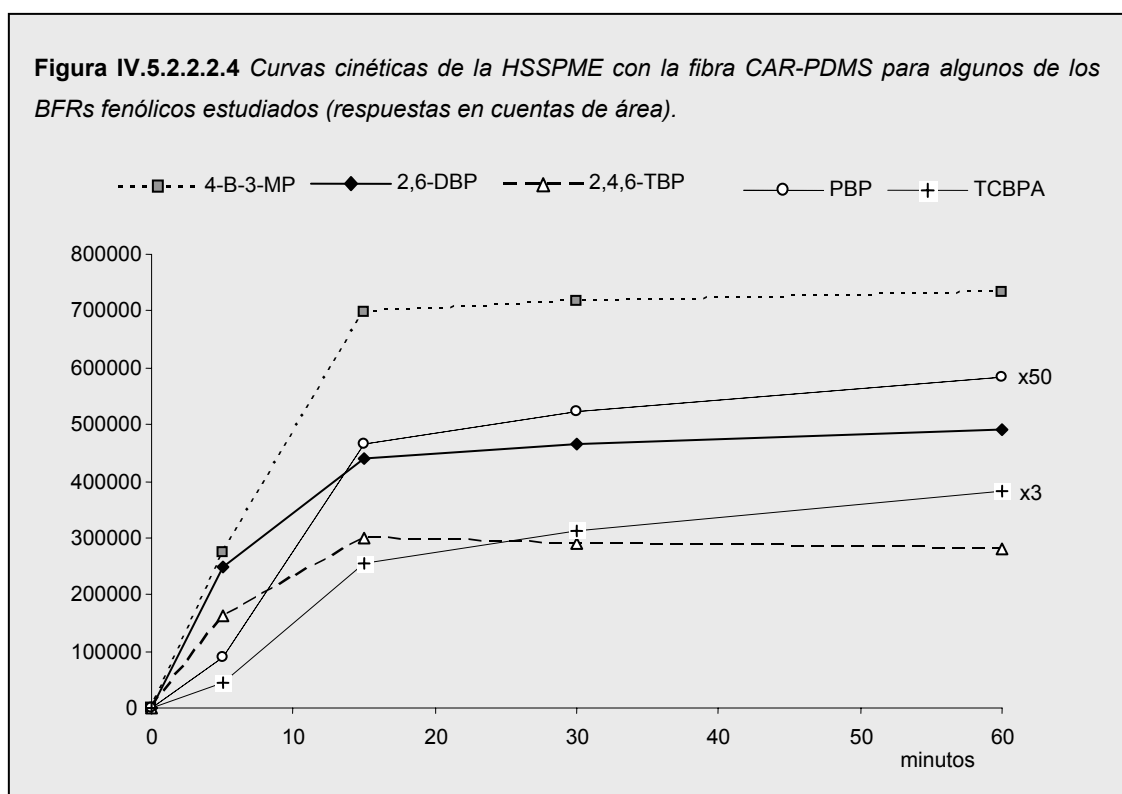
Como ya se ha comentado, el hecho de que la agitación no afecte a la extracción del resto de los compuestos bromados, indica que bajo las condiciones de extracción utilizadas y para el tiempo de extracción marcado (30 min) ya se ha alcanzado el equilibrio.

Para confirmar este supuesto, se incluyó el estudio de la influencia del tiempo de extracción en la HSSPME de los nueve BFRs fenólicos.

Para ello, se llevaron a cabo extracciones durante 0, 5, 15, 30 y 60 minutos, bajo las condiciones experimentales siguientes: PDMS-DVB, 100°C y con agitación.

Las curvas cinéticas obtenidas para algunos compuestos representativos se muestran en la **Figura IV.5.2.2.4**.

Tal como puede apreciarse, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, en general, está directamente relacionado con el peso molecular de los compuestos.



Confirmando los resultados encontrados en el estudio de la agitación, para los compuestos menos bromados (incluyendo el TBP) las cinéticas de extracción son relativamente rápidas y el equilibrio se alcanza en aproximadamente 15 minutos. Sin embargo, para el PBP y los bisfenoles, el equilibrio no se alcanza con 30 minutos de extracción, aunque parecen estar próximos a esta condición con 60 min de exposición.

En general, tal como se observa en las gráficas, el incremento de las respuestas para los compuestos que no están en equilibrio al aumentar el tiempo de extracción de 30 a 60 min, es inferior a un 10%. Por tanto, dado que es necesario establecer un compromiso entre el tiempo de análisis y la sensibilidad del método, se decidió mantener 30 minutos como tiempo de extracción.

#### IV.5.2.3 CARÁCTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE ACETILACIÓN-*IN SITU*-HSSPME PROPUESTO.

##### IV.5.2.3.1 Condiciones experimentales

En el estudio de los parámetros analíticos de calidad del método se emplearon las condiciones experimentales optimizadas por el diseño y las pruebas posteriores, que aparecen recogidas en la **Tabla IV.5.2.3.1**.

**Tabla IV.5.2.3.1** *Condiciones experimentales del método de determinación de BFRs fenólicos en muestras de agua.*

Parámetro	Valor
Fibra	CAR-PDMS, PDMS
Temperatura	100°C
Modo de muestreo	HSSPME
Volumen de muestra	10 mL
Volumen del vial	22 mL
Agitación	Si (magnética)
Adición de sal	35% (p/v)
Tiempo de extracción	30 min

##### IV.5.2.3.2 Linealidad, precisión y LODs

La linealidad del método se evaluó mediante la realización de estudios de calibrado empleando ambas fibras, CAR-PDMS y PDMS, analizando disoluciones de agua Milli-Q a distintos niveles de concentración. El rango de concentraciones estudiado fue desde los 0.1 ng/mL a los 10 ng/mL para todos los compuestos.

En la **Tabla IV.5.2.3.2.1** se recogen los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) correspondientes a las curvas de calibrado de cada compuesto.

**Tabla IV.5.2.3.2.1.** Coeficientes de correlación y valores de  $F$  y  $p$  para el test de fallo de ajuste, obtenidos en el estudio de la linealidad del método de HSSPME para los BFRs fenólicos.

Compuesto	Coeficiente de regresión ( $R^2$ )		Valores de $F$		Valores de $p$	
	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS
2-BP	0.9980	0.9967	4.66	3.74	0.12	0.09
2-B-4-MP	0.9978	0.9983	4.74	1.48	0.12	0.31
4-B-3-MP	0.9987	0.9988	1.93	0.83	0.30	0.54
2,6-DBP	0.9960	0.9979	6.96	3.94	0.07	0.05
2,4-DBP	0.9996	0.9990	1.23	3.16	0.43	0.10
2,4,6-TBP	0.9997	0.9999	6.65	0.90	0.08	0.50
PBP	0.9990	0.9994	0.18	1.80	0.70	0.23
TCBPA	0.9977	0.9990	0.01	0.09	0.93	0.96
TBBPA	0.9964	0.9972	0.02	0.03	0.98	0.99

Todos los compuestos presentaron una relación directamente proporcional, entre la cantidad de analito extraída y la que existe inicialmente en la muestra, tanto con la fibra de CAR-PDMS ( $R^2 \geq 0.996$ ), como con la fibra de PDMS ( $R^2 \geq 0.997$ ).

Para completar el estudio, se realizó un análisis de la varianza de la regresión (ANOVA).

Éste análisis se compone del test de fallo de ajuste, que determina si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos experimentales obtenidos, o si debería utilizarse un modelo más complejo. El test compara la variabilidad de los residuales del modelo propuesto con la variabilidad de los datos observados (cuentas de área) para los valores replicados de la variable independiente (concentración conocida de cada uno de los compuestos en las muestras de agua Milli-Q). Los resultados del ANOVA para el rango de concentraciones considerado y un intervalo de confianza del 95% también se recogen en la **Tabla IV.5.2.3.2.1**.

Los valores de  $p$  para el test de fallo de ajuste fueron iguales o mayores a 0.05, esto nos indica que el modelo lineal de primer orden seleccionado resulta adecuado para explicar los datos experimentales, para todos los compuestos con ambas fibras.

Los LODs se estimaron como la concentración correspondiente a una señal analítica tres veces superior al ruido de fondo. Para calcular la señal correspondiente al ruido de fondo, se promedió el área de cinco picos tomados en las proximidades del pico cromatográfico<sup>7</sup>.

Los LODs estimados para cada uno de los compuestos se recogen en la **Tabla 5.2.3.2.2**, y como puede comprobarse, estos fueron inferiores a 15 pg/mL con la fibras de CAR-PDMS, excepto para el PBP (46 pg/mL); e inferiores a 16 pg/mL con la fibra de PDMS, remarcando la alta sensibilidad del método con ambas fibras.

**Tabla IV.5.2.3.2.2.** Límites de detección obtenidos mediante acetilación-in situ-HSSPME-GC-MS para los BFRs fenólicos incluidos en este estudio.

Compuesto	LODs (S/N=3, pg/mL)	
	CAR-PDMS	PDMS
2-BP	2.1	16
2-B-4-MP	1.3	6.5
4-B-3-MP	2.2	9.2
2,6-DBP	2.0	8.0
2,4-DBP	2.2	13
2,4,6-TBP	1.3	2.5
PBP	46	12
TCBPA	15	12
TBBPA	12	12

La precisión del procedimiento experimental se evaluó a dos niveles de concentración, 0.1 y 2 ng/mL, calculando la desviación estándar relativa (RSD) de tres réplicas para cada nivel. En la **Tabla IV.5.2.3.2.3** se muestran los valores de RSD calculados.

**Tabla IV.5.2.3.2.3.** Precisiones del método propuesto para la determinación de BFRs fenólicos.

Compuesto	Repetibilidad (RSD %, n=3)			
	0.1 ng/mL		2 ng/mL	
	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS
2-BP	4.9	3.2	6.9	4.3
2-B-4-MP	4.6	5.0	7.1	1.6
4-B-3-MP	5.8	9.5	8.2	9.5
2,6-DBP	6.9	6.7	7.6	6.7
2,4-DBP	2.3	0.5	5.5	7.8
2,4,6-TBP	6.8	2.8	2.9	5.9
PBP	23	5.0	19	8.4
TCBPA	7.5	13	8.1	11
TBBPA	8.4	18	7.4	10

Para el nivel más bajo de concentración, los valores de RSD fueron inferiores al 10% para todos los compuestos y con ambas fibras, excepto para el PBP con la fibra de CAR-PDMS (23%) y para los bisfenoles con la fibra de PDMS (13% TCBPA y 18% TBBPA). Para el nivel

más alto de concentración los valores de RSD fueron similares que los encontrados a 0.1 ng/ml, siendo el PBP otra vez el que presenta la menor precisión con la fibra de CAR-PDMS.

#### IV.5.2.3.3 Análisis de muestras reales

Debido a que el proceso de microextracción se puede ver influenciado por la naturaleza de la matriz, es necesario demostrar que el método es aplicable al análisis de muestras reales.

En este estudio se incluyeron tres tipos de muestras reales, agua de grifo y el efluente y el influente de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. Las muestras se analizaron mediante el método propuesto e inicialmente no se encontraron concentraciones detectables de los analitos estudiados, siendo por tanto adecuadas para realizar estudios de recuperación. A las muestras de agua de grifo y efluente se les adicionó una concentración de 0.5 ng/mL de cada uno de los compuestos, mientras que al influente se le adicionó 1 ng/mL. Las concentraciones de cada analito se determinaron mediante calibrado externo obtenido mediante análisis de estándares en Milli-Q. La recuperación para cada compuesto en cada una de las muestras se calculó, entonces, como la relación entre la concentración medida según la curva de calibrado y la concentración adicionada, expresada en porcentaje.

En la **Tabla IV.5.2.6.1** se recogen las recuperaciones encontradas que, para la mayoría de los compuestos considerados, fueron cuantitativas.

**Tabla IV.5.2.6.1** Recuperaciones (en %) de los BFRs fenólicos en las muestras reales estudiadas.

Compuestos	Recuperaciones % ( $\pm$ RSD, n=3)					
	Agua de grifo	Efluente		Influente		Influente*
	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	PDMS
<b>2-BP</b>	106 $\pm$ 5	101 $\pm$ 5	102 $\pm$ 15	104 $\pm$ 15	102 $\pm$ 8	98 $\pm$ 14
<b>2-B-4MP</b>	104 $\pm$ 6	102 $\pm$ 5	104 $\pm$ 13	96 $\pm$ 10	100 $\pm$ 15	100 $\pm$ 23
<b>4-B-3MP</b>	100 $\pm$ 14	105 $\pm$ 6	103 $\pm$ 8	100 $\pm$ 13	108 $\pm$ 9	98 $\pm$ 8
<b>2,6-DBP</b>	99 $\pm$ 1	107 $\pm$ 8	102 $\pm$ 2	98 $\pm$ 7	106 $\pm$ 16	92 $\pm$ 14
<b>2,4-DBP</b>	99 $\pm$ 3	102 $\pm$ 18	108 $\pm$ 2	117 $\pm$ 4	110 $\pm$ 13	102 $\pm$ 12
<b>2,4,6-TBP</b>	106 $\pm$ 4	108 $\pm$ 1	111 $\pm$ 15	108 $\pm$ 4	92 $\pm$ 15	108 $\pm$ 11
<b>PBP</b>	91 $\pm$ 5	103 $\pm$ 7	103 $\pm$ 5	113 $\pm$ 5	108 $\pm$ 7	107 $\pm$ 8
<b>TCBPA</b>	96 $\pm$ 6	98 $\pm$ 1	104 $\pm$ 8	20 $\pm$ 7	17 $\pm$ 4	107 $\pm$ 11
<b>TBBPA</b>	101 $\pm$ 7	-	109 $\pm$ 13	13 $\pm$ 9	20 $\pm$ 5	108 $\pm$ 4

\* Mediante calibrado por adición

La cuantificación mediante calibración externa demuestra así que resulta aceptable ya que no se evidencia la presencia de efecto matriz, excepto para los bisfenoles en la muestra de influente. Sin embargo, hay que puntualizar que esta muestra es la más compleja de todas las estudiadas.

En este caso, se aplicó el método de calibración mediante adición de estándares, consistente en adicionar a la propia muestra distintos niveles de concentración de los compuestos. Igual que con el método anterior, las recuperaciones se calcularon como la relación entre la concentración medida según la curva de calibrado y la concentración adicionada, expresada en porcentaje. Éstas aparecen recogidas en la última columna de la **Tabla IV.5.2.6.1** y, como puede verse, con este método fueron cuantitativas para todos los compuestos incluyendo TCBPA y TBBPA.

También es importante mencionar que, excluyendo a algún dato en particular, la mayoría de las recuperaciones presentaron una RSD inferior al 15% incluso para el PBP empleando la fibra de CAR-PDMS y para los bisfenoles con la fibra de PDMS, los cuales en el estudio de la precisión habían presentado los peores resultados.

En conclusión, la aplicabilidad del método en el análisis de muestras reales queda claramente confirmada, incluyendo las muestras de matriz más compleja.

#### IV.5.2.4 DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS BFRs FENÓLICOS CON OTROS CONTAMINANTES FENÓLICOS

En estudios previos respecto al análisis mediante SPME de otros contaminantes fenólicos, como los clorofenoles, las condiciones de extracción optimizadas fueron similares a las seleccionadas en este estudio para los BFRs fenólicos (CAR-PDMS o PDMS, HSSPME y 100°C)<sup>16</sup>.

Este hecho abre la posibilidad de que el método propuesto pueda utilizarse para el análisis simultáneo de los BFRs y otros contaminante fenólicos (incluyendo los clorofenoles).

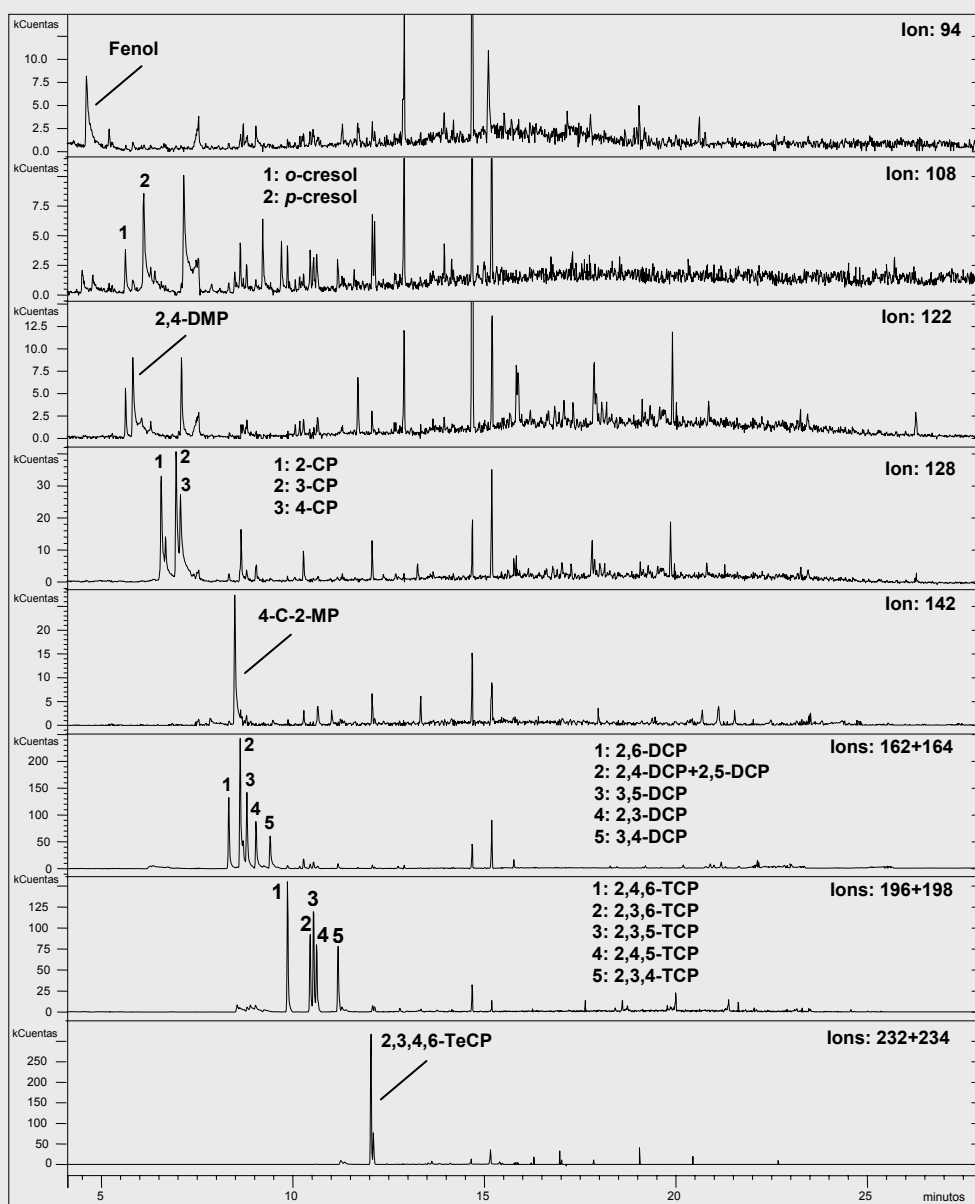
En la **Figura IV.5.2.7.1** se muestran los cromatogramas de ión seleccionado de una muestra de agua conteniendo 1 ng/mL de fenol, cuatro fenoles metilados, y dieciséis clorofenoles (incluyendo tres mono, seis di- y cinco triclorofenoles, un tetra y el pentaclorofenol), así como, los nueve compuestos objeto de estudio (ocho bromofenoles y TCBPA).

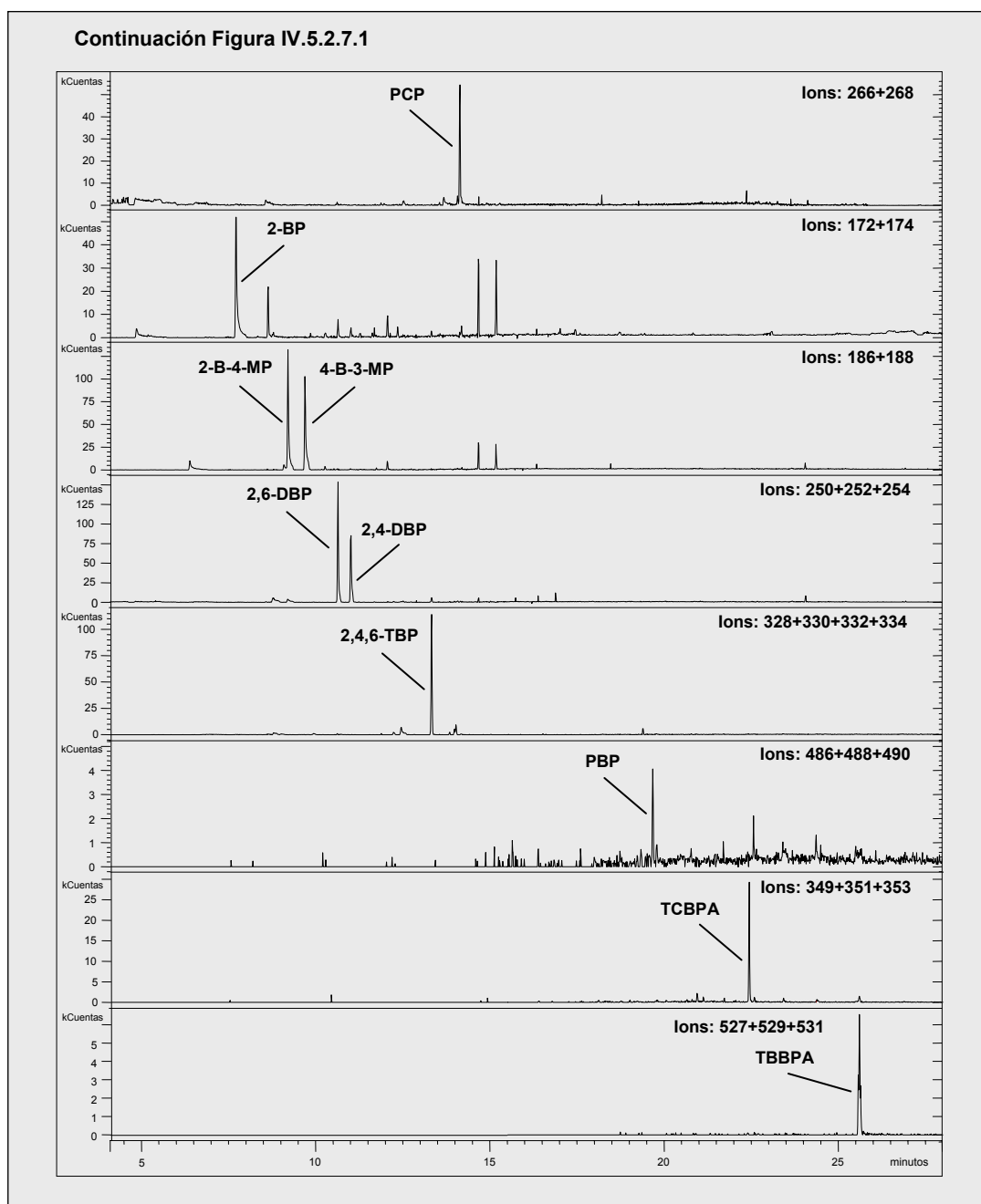


La extracción se realizó en el modo HSPME a 100°C y con la fibra de CAR-PDMS, durante 30 min.

Como puede observarse, pudo realizarse la extracción simultánea de todas las familias de fenoles incluidas.

**Figura IV.5.2.7.1.** Cromatogramas de iones seleccionados obtenido mediante HSPME con la fibra de CAR-PDMS de una muestra de agua Milli-Q conteniendo 1 ng/mL de los compuestos fenólicos considerados.





Además, se demostró la aplicabilidad real de este método de SPME general mediante el análisis de cuatro muestras de agua complejas, como el influente de una planta de tratamiento de aguas residuales y aguas de desecho procedentes de tres colectores urbanos situados en diferentes puntos.

Las concentraciones de los compuestos detectados se calcularon mediante calibración externa con ambas fibras CAR-PDMS y PDMS. Adicionalmente, la muestra más compleja (el influente) se evaluó mediante adición de estándares.

Las concentraciones obtenidas se resumen en la **Tabla IV.5.2.7.2**.

**Tabla IV.5.2.7.2** Concentraciones (en ng/mL) de los compuestos fenólicos encontrados en las muestras reales analizadas, calculadas mediante calibrado externo.

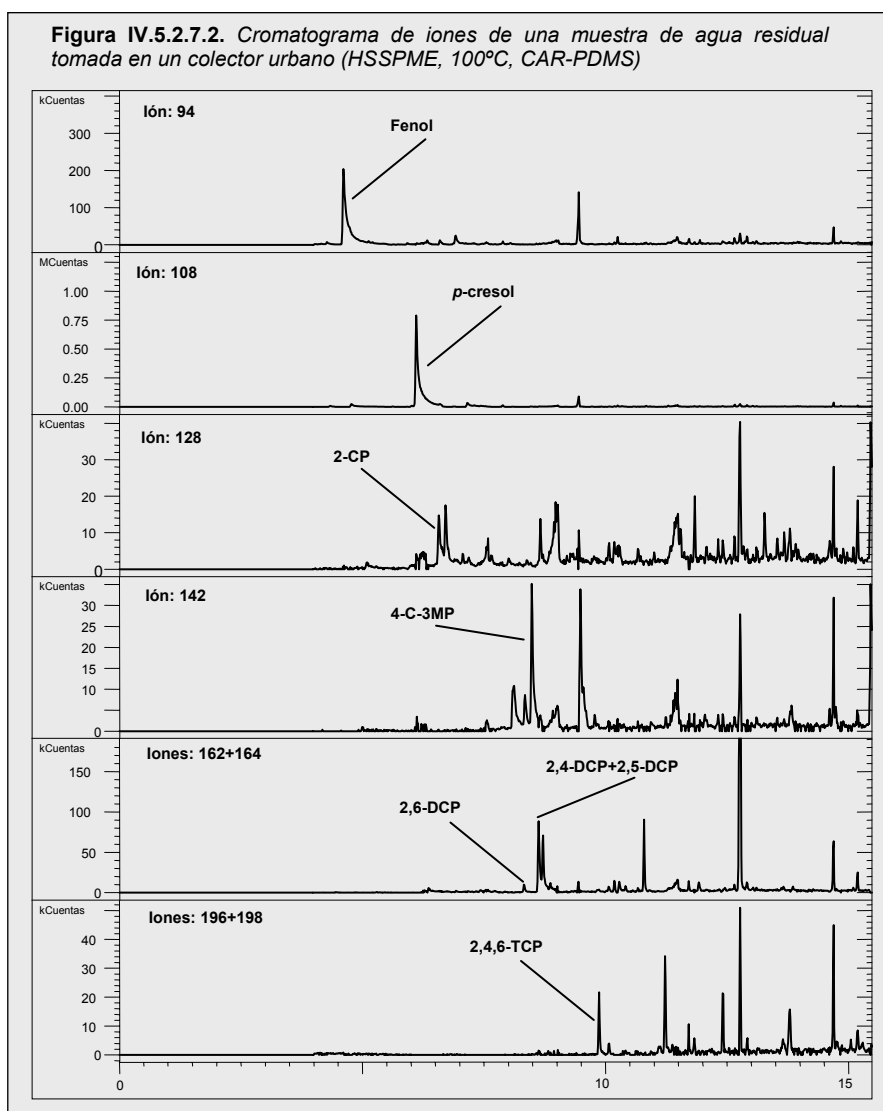
Compuestos	Concentración (ng/mL)							
	Influente (n=3)	Influente* (n=3)	Agua de colector urbano 1 (n=2)		Agua de colector urbano 2 (n=2)		Agua de colector urbano 3 (n=2)	
	CAR-PDMS	CAR-PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS
Phenol	0.97±0.09	0.96±0.09	4.3	4.9	5.9	4.7	8.5	9
<i>p</i> -cresol	3.0±0.9	3.7±0.6	36	36	72	79	103	127
2-CP			0.20	-	0.12	-	0.071	-
2,3-DMP	0.80±0.03	0.74±0.03						
4-C-3MP			0.64	0.63				
2,6-DCP	0.013±0.005	0.014±0.005	0.077	0.077	0.015	0.014	0.047	0.064
2,4-DCP+2,5-DCP	0.130±0.004	0.109±0.004	0.46	0.42	0.96	0.82	0.77	0.62
2,4,6-TCP	0.032±0.001	0.030±0.001	0.28	0.26	0.28	0.25	0.23	0.24
PCP							0.13	0.14

\* Mediante calibrado por adición

Los compuestos encontrados fueron el fenol, el *p*-cresol, el 2-CP, el 2,3-DMP, el 4-C-3MP, el 2,6-DCP, 2,4-DCP+2,5-DCP, el 2,4,5-TCP y el PCP. En general las concentraciones son del orden de los pocos ng/mL o inferiores, y sólo el fenol y el *p*-cresol aparecen a concentraciones altas (de 1 a 9 ng/mL y de 3 a 127 ng/ml, respectivamente).

Para la muestra de influente, los resultados obtenidos con ambos métodos de cuantificación fueron similares sin verse influenciados por la matriz de la muestra. Por tanto, la cuantificación mediante calibrado externo vuelve a demostrar ser adecuada para la determinación de fenoles en muestras reales. También queda patente que los valores de concentración obtenidos con ambas fibras son comparables.

La **Figura IV.5.2.7.2** corresponde a una muestra real contaminada (agua de desecho de un colector urbano), en la que se muestran los cromatogramas de iones correspondientes a los ocho compuestos fenólicos, incluido el *p*-cresol a un nivel de concentración alto.



Con este estudio, se demuestra también la aplicabilidad del método de acetilación-*in situ*-HSSPME-GC-MS para la determinación simultánea de bromofenoles junto con otros contaminantes fenólicos en muestras complejas. De este modo, se consigue analizar un importante número de contaminantes fenólicos utilizando un único método, disminuyendo las etapas de manipulación de muestra y el tiempo necesario para el análisis.

Los resultados de este estudio se han publicado en la revista **Journal of Chromatography A 1124 (2006) 11**, y que se recoge, junto con el resto de artículos de este Tesis, en el Anexo VI.2.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) R. Bloom, A. Eklund, P. Hedemalm, J. Hågsström, Brominated Flame Retardants—a Global Status Report, Orango Miljökonsulter, Gothenburg, Suecia, Marzo, 2000.
- (2) C.A. de Witt, Brominated Flame Retardants, Swedish Environmental Protection Agency, Report 5065, Estocolmo, 2000.
- (3) T. Hyötyläinen, K. Hartonen, TrAC Trends Anal. Chem. 21 (2002) 13-29.
- (4) M. Alaei, D. B. Sergeant, M. G. Ikononov, J. M. Luross Chemosphere 44 (2001) 1489.
- (5) E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 205.
- (6) T.A. Verslycke, A.D. Vethaak, K. Arijs, C.R. Janssen, Environ. Pollut. 136 (2005) 19.
- (7) J.L. Acero, P. Piriou, U. von Gunten, Water Res. 39 (2005) 2979.
- (8) U. Sellström, B. Jansson, Chemosphere 31 (1995) 3085.
- (9) C. Shaogang, G.D. Haffner, R.J. Letcher, J. Chromatogr. A 1097 (2005) 25.
- (10) A. Smeds, P. Saukko, Chemosphere 53 (2003) 1123.
- (11) T. Hayama, H. Yoshida, S. Onimaru, S. Yonekura, H. Kuroki, T. Kenichiro, H. Nohta, M. Yamaguchi, J. Chromatogr. B 809 (2004) 131.
- (12) C. Thomsen, K. Janák, E. Lundanes, G. Becher, J. Chromatogr. B 750 (1) (2001) 1.
- (13) K. Öberg, K. Warman, T. Öberg, Chemosphere 48 (2002) 805.
- (14) M. del Olmo, A. Zafra, B. Suarez, A. Gonzalez-Casado, J. Taoufiki, J. Vilchez, J. Chromatogr. B 817 (2005) 167.
- (15) A. Zafra, M. del Olmo, B. Suárez, E. Hontoria, A. Navalón, J.L. Vilchez, Water Res. 37 (2003) 735.
- (16) M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, J. Chromatogr. A 963 (2002) 137.
- (17) L. Renberg, K. Lindström, J. Chromatogr. 214 (1981) 327.

- (18) Varian, Inc. Saturn GC/MS Workstation. Version 5.4. Software Reference: Operator's Manual. Varian Analytical Instruments. Walnut Creek, California. 1999.
- (19) I. Rodríguez, M.P. Llompart, R. Cela, J. Chromtogr. A 885 (2000) 291.
- (20) Y. Hanada, I. Imaizumi, K. Kido, T. Tanizaki, M. Koga, H. Shiraishi, M. Soma, Anal. Sci. 18 (2002) 655.
- (21) K. D. Buchholz, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 66 (1994) 160.
- (22) H. Lee, L. Weng, A.S.Y. Chau, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67 (1984) 789.
- (23) M. Llompart, B. Blanco, R. Cela, J. Microcol. Sep. 12 (2000) 25.
- (24) Statgraphics-Plus Version 5.1, Experimental design, Appendix C, Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA, 2001.
- (25) J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction: Theory and Practice, Ed. Wiley-VCH, New York, 1997.
- (26) M. Polo, G.. Gómez-Noya, J.B. Quintana, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, Anal. Chem. 76 (2004) 1054.
- (27) M. Llompart, K. Li, M. Fingas, Anal. Chem. 70 (1998) 2510.
- (28) P. Landín, M. Llompart, M. Lourido, R. Cela, J. Microcol. Sep. 13 (2001) 275.
- (29) H. Kuramochi, K. Maeda, K. Kawamoto, Organohalogen Compd. 63 (2003) 337.
- (30) M. Möder, P. Popp, R. Eisert, J. Pawliszyn, Fresenius J. Anal. Chem. 363 (1999) 680.
- (31) F. Fernández, J. Betran, F.J. López, J.V. Gaspar, Anal. Chem. 72 (2000) 2312.

## **V. CONCLUSIONES**





## V. CONCLUSIONES

Tras la discusión de los resultados obtenidos en los estudios incluidos en el Capítulo anterior, es conveniente revisar los objetivos marcados en un principio y ver si se alcanzado estos objetivos, extrayendo las conclusiones más relevantes al respecto.

En general, se ha demostrado la viabilidad de la SPME para la determinación de las diferentes familias de contaminantes orgánicos emergentes considerados en muestras acuosas, resultando una alternativa válida a las técnicas utilizadas habitualmente en la etapa de preparación de muestra.

La optimización de los parámetros que afectan al proceso de microextracción mediante diseño experimental permitió minimizar el número de experimentos a realizar y conseguir una interpretación más completa de los resultados al evaluar también las interacciones que pudieran producirse entre los factores.

La selección de la fibra más adecuada para cada aplicación y el modo de muestreo fueron los parámetros más importantes a tener en cuenta al desarrollar el método analítico basado en SPME. Además, para mejorar la eficacia del proceso, se tuvieron en cuenta diferentes parámetros que afectan a la etapa de extracción como el tiempo de muestreo, la temperatura, la aplicación de agitación o la adición de sal.

La evaluación de las características analíticas de calidad de los métodos desarrollados, confirmaron la sensibilidad de los mismos, obteniendo LODs, en la mayoría de los casos, inferiores a los publicados hasta el momento, obteniendo buena correlación lineal en los rangos de concentraciones estudiados y demostrando su aplicabilidad en el análisis de muestras reales.

En los siguientes apartados se resumen las conclusiones extraídas en concreto para cada uno de los estudios.

### V.1. DETERMINACIÓN DE FRAGANCIAS SINTÉTICAS EN MUESTRAS ACUOSAS

En la primera parte de este estudio enfocado hacia la determinación de la familia completa de fragancias nitrogenadas, se desarrolló un método de SPME acoplada a la cromatografía de gases con detector de micro captura electrónica (GC- $\mu$ ECD).

Las principales conclusiones de este estudio son, que:

- El diseño factorial fraccionado, permite obtener, con pocas experiencias, una amplia información de la optimización e influencia de los factores en el proceso de extracción.
- Los valores óptimos para los factores significativos dados por el diseño fueron, el muestreo en espacio de cabeza, a 100°C, resultando esenciales para alcanzar una mayor sensibilidad.
- Se recomiendan las fibras CAR/PDMS o PDMS/DVB en la extracción de nitrofragancias, ya que la respuesta obtenida con ambas fibras es similar.
- La adición de sal no presenta un efecto significativo en la extracción de los compuestos.
- El método de HSSPME desarrollado presenta una alta sensibilidad, con LODs del orden de los pg/mL, buena correlación lineal en el rango de concentraciones estudiado y buena repetibilidad para las cuatro nitrofragancias.
- Demuestra su aplicabilidad para el análisis de diferentes muestras reales, incluyendo aguas residuales.

Siguiendo el estudio iniciado con las fragancias nitrogenadas, en la segunda parte del estudio, se llevó a cabo la puesta a punto de una metodología para la determinación de siete fragancias, incluyendo seis policíclicas y una macrocíclica, en muestras acuosas mediante el acoplamiento de la SPME, como técnica de preparación de muestras, y la GC-MS, como técnica de separación y detección.

Las conclusiones extraídas de este estudio son:

- Para una mayor eficiencia del proceso de extracción se recomienda trabajar con HSSPME para todas las fibras estudiadas.
- Los tipos de fibra CAR-PDMS y PDMS-DVB son los que presentan mejores recuperaciones para todos los compuestos, por lo que, en principio cualquiera

de ellas podría utilizarse para determinar estos compuestos. Sin embargo, la fibra CAR-PDMS presenta mayor efecto memoria que la fibra PDMS-DVB.

- Para la extracción mediante HSSPME se consigue una mayor eficacia trabajando a 100°C.
- Mediante la agitación magnética de las muestras durante la extracción no se mejoran las respuestas.
- La evaluación del efecto salino indica que la adición de sal no favorece la extracción de las fragancias estudiadas.
- La desorción de la fibra en el cromatógrafo de gases durante 2 min, y posterior desorción en otro cromatógrafo durante 5 min, garantizan la eliminación de las fragancias de las fibras.
- La linealidad y repetibilidad de ambas fibras son satisfactorias, con unos valores del coeficiente de correlación superiores a 0.990 para todos los compuestos, con una sólo excepción. Los límites de detección obtenidos para una relación señal/ruido igual a 3 son del orden de los pg/mL.
- En el análisis de muestras de agua de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas se detectaron cinco de los siete compuestos estudiados, siendo Galaxolide y Tonalide las que presentan una mayor concentración, lo cual resulta coherente con los resultados obtenidos por otras investigaciones, debido a que estos compuestos son los utilizados mayoritariamente en las formulaciones de los productos de limpieza.

Además, se demostró la posibilidad del análisis simultáneo de los distintos tipos de fragancias mediante un único método basado en HSSPME/GC/MS, ya que las condiciones de extracción que se obtuvieron para el análisis de la familia de las fragancias nitrogenadas (CAR-PDMS o PDMS-DVB, HSSPME y 100°C), fueron similares a las obtenidas para las fragancias policíclicas.

## V.2. DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE AGUA

En este apartado, se desarrolló un método de SPME acoplada a la GC-MS para el análisis de los ftalatos en muestras de agua, prestando especial atención a los aspectos metodológicos encaminados a minimizar el problema de la contaminación.

Las principales conclusiones son, que:

- Las mejores respuestas se alcanzan trabajando con la fibra de PDMS-DVB a 100°C, aunque para DEHP las respuestas con PA y PDMS-DVB son comparables.
- Para DMP, DEP y BBP, la eficacia de extracción fue mayor mediante el muestreo directo (DSPME) a cualquier temperatura. Para el DEHP y DOP, se observa una interacción entre ambos factores. A bajas temperaturas la respuesta mediante HSSPME es muy baja, por tanto se recomienda trabajar en DSPME, en este intervalo de temperaturas. A 100°C, sin embargo, se produce un incremento muy pronunciado de la respuesta para HSSPME.
- La agitación presenta un efecto significativamente positivo sobre la DSPME de todos los ftalatos estudiados
- La adición de sal provoca un incremento en la respuesta para el DMP y el DEP, los compuestos más hidrofílicos y de menor peso molecular, mientras que para el resto de los compuestos, se observa un descenso en la señal, sobre todo en el caso del DOP.
- El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, en general, está directamente relacionado con el peso molecular de los ftalatos. Para DMP y DEP, las cinéticas de extracción son relativamente rápidas y el equilibrio se alcanza en aproximadamente 40 minutos. Para el resto de los compuestos, el equilibrio no se alcanza incluso con 80 minutos de exposición.
- El método de DSPME desarrollado para la determinación de ftalatos en agua presenta buena correlación en un rango lineal amplio, con LODs muy inferiores a los encontrados en estudios anteriores utilizando SPME, permitiendo su aplicación tanto al análisis de aguas potables como aguas residuales.
- El DEP, el DBP y el DEHP son los compuestos encontrados a concentraciones más altas en las muestras analizadas.
- Al contrastar los resultados obtenidos para el influente y el efluente, se observa una reducción importante en las concentraciones de estos compuestos por lo que los tratamientos son esenciales para su eliminación.

### V.3. DETERMINACIÓN DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs) EN MUESTRAS DE AGUA

Con este estudio se confirmó que la SPME es una técnica adecuada para la extracción de los PBDEs y los PBBs, y se desarrolló un método de detección basado en la GC acoplada a espectrometría de masas en tandem (MS/MS), para obtener una mayor sensibilidad y selectividad en la determinación:

- Los parámetros del método de MS-MS, se optimizaron mediante la utilización de la herramienta AMD (*Automated Method Development*).
- El patrón de fragmentación mayoritario es el correspondiente a la pérdida de dos átomos de bromo,  $[M-2Br]^+$  (para PBB-15, BDE-47, BDE-100, BDE-99, BDE-153 y BDE-154), de manera similar al comportamiento encontrado previamente para la familia de los PCBs.

En la comparación de cinco fibras comerciales, la eficacia obtenida con PDMS y PA, recubrimientos homogéneos, es superior a la obtenida con las fibras restantes, que presentan recubrimientos poliméricos con partículas porosas. Para la optimización de los parámetros que afectan a la SPME, se aplicó, como en los estudios anteriores, un diseño experimental:

- La fibra y el modo de muestro presentan un efecto importante en la extracción de todos los congéneres estudiados.
- Se obtiene una extracción más eficaz con la fibra de PDMS.
- Se mejora el resultado de la extracción si se muestrea el espacio de cabeza en lugar de realizar el muestreo directo. La única excepción son los congéneres hexabromados (BDE-153 y BDE-154), para los cuales la eficacia de extracción mejora en inmersión, aunque este factor no es significativo.
- La microextracción se favorece mediante la agitación de las muestras.
- La adición de sal sólo presenta un efecto claramente positivo para el BDE-3.

La linealidad, la precisión y la sensibilidad del método también se han evaluado, encontrando los LODs y LOQs al nivel de los fg/mL.

La validación del método analítico propuesto demostró que las características representativas del mismo cumplen con las especificaciones para su aplicación en el análisis de los compuestos estudiados a nivel traza en muestras de agua y aguas residuales. Además reúne las cualidades para ser considerado un método fiable, reproducible y sobre todo sensible, es decir, permite alcanzar límites de detección y cuantificación bajos.

#### V.4 ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE MICROEXTRACCIÓN ( $K_{fs}$ ) DE BIFENILOS POLIBROMADOS (PBBs) Y DIFENIL ÉTERES POLIBROMADOS (PBDEs)

En este estudio, se realizó la estimación de los coeficientes de partición entre la fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) y muestras de agua, basándose en la depleción mediante extracciones múltiples como método de calibración, comprobándose que resulta un método muy adecuado.

Las conclusiones más relevantes son, que:

- La inyección directa de estándares de distintas concentraciones y volúmenes como calibrado externo de SPME no es válida, sin una optimización de las condiciones cromatográficas, debido a que las pérdidas en inyección directa parecen ser mayores que en SPME.
- La extracción múltiple de una muestra es un modelo de calibrado interno que permite conocer la cantidad extraída por la fibra de SPME y el cálculo de la eficacia de extracción.
- Las eficacias obtenidas a 100°C varía entre el 0.15 (BDE-3) y el 0.68 (PBB-49).
- El valor de  $\log K_{fs}$  a 100°C para los compuestos objeto de estudios varía entre 3.47 y 5.30.
- Las cinéticas de extracción a 25°C demuestran que todos los compuestos están bajo condiciones cinéticas con el tiempo de extracción seleccionado para el estudio de depleción a 25°C (24h).
- Para el cálculo de  $K_{fs}$  a 25°C es necesario obtener la constante cinética  $b$  mediante el ajuste de las curvas cinéticas. Los valores de  $K_{fs}$  para BDE-3, PBB-15, PBB-49 y BDE-47 son mayores que los obtenidos a 100°C, de acuerdo con fundamentos termodinámicos de SPME.
- El cálculo de  $K_{fs}$  es complejo y requiere tener una serie de variables en cuenta, como el volumen de muestra, las pérdidas, la eficacia de extracción, las condiciones de equilibrio, etc, pero también se debe tener en cuenta el modo de calibración ya que puede ser la principal fuente de error.
- Se puede establecer una correlación lineal entre los valores de  $K_{fs}$  y  $K_{ow}$ , y con los BFC por lo que los  $K_{fs}$  son tan adecuados como los  $K_{ow}$  para estimar el potencial de bioacumulación de los contaminantes orgánicos en los tejidos grasos de los animales.

### V.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS IGNIFUGOS FENÓLICOS EN MUESTRAS ACUOSAS AMBIENTALES

Se implementó un método de determinación de compuestos halogenados fenólicos en muestras de agua, incluyendo la familia de los bromofenoles y los bisfenoles TCBPA y TBBPA, basado en la SPME seguida por GC-MS. Para ello fue necesario introducir una etapa de derivatización *in situ* obteniendo los correspondientes derivados acetilados.

Las principales conclusiones de este estudio son, que:

- El procedimiento de acetilación-*in situ*-SPME es viable en el análisis de los ignífugos considerados y empleando las condiciones cromatográficas optimizadas se consigue una buena resolución de los compuestos
- En cuanto al tipo de recubrimiento, CAR-PDMS y PDMS-DVB son las fibras que proporcionan una mayor respuesta en el análisis de los compuestos con menor grado de bromación. Para los compuestos más bromados, PBP y TBPA, la fibra de PDMS es la que resulta más eficaz.
- Parece apreciarse una relación entre el peso molecular de los compuestos y la eficacia de extracción para la fibra de CAR-PDMS.
- El modo HSSPME presentó mejores respuestas a temperaturas altas mientras que a temperatura ambiente resultó más eficaz el muestreo directo.
- La adición de sal es un factor importante para alcanzar mejores eficacias de extracción para todos los compuestos
- La agitación sólo presenta un efecto significativamente positivo en la extracción de los bisfenoles.
- Para los compuestos menos bromados (incluyendo el TBP) las cinéticas de extracción son relativamente rápidas y el equilibrio se alcanza en aproximadamente 15 minutos. Para el PBP y los bisfenoles, el equilibrio no se alcanza con 30 minutos de extracción.
- Todos los compuestos presentaron una relación directamente proporcional, entre la cantidad de analito extraída y la que existe inicialmente en la muestra, tanto con la fibra de CAR-PDMS ( $R^2 \geq 0.996$ ), como con la fibra de PDMS ( $R^2 \geq 0.997$ ).
- Los LODs estimados para cada uno de los compuestos son inferiores a 15 pg/mL con la fibra de CAR-PDMS, excepto para el PBP (46 pg/mL); e inferiores a 16 pg/mL con la fibra de PDMS, remarcando la alta sensibilidad del método con ambas fibras.

- Las recuperaciones obtenidas en muestras reales son cuantitativas incluso con muestras complejas (influyente) demostrando su aplicabilidad en este tipo de análisis.

Considerando que los clorofenoles pueden ser uno de los principales problemas de contaminación del medio acuático, se decidió investigar la posibilidad de proponer un método para el análisis simultáneo de clorofenoles y bromofenoles en agua.

Con este estudio, se demostró también la aplicabilidad del método de acetilación-*in situ*-HSSPME-GC-MS para la determinación simultánea de bromofenoles junto con otros contaminantes fenólicos en muestras complejas. De este modo, se consigue analizar un importante número de contaminantes fenólicos utilizando un único método, disminuyendo las etapas de manipulación de muestra y el tiempo necesario para el análisis.



## **VI. ANEXOS**



## VI.1. ACRÓNIMOS

<b>ADBI</b>	<i>Celestolide</i>	7-acetil-1,1-dimetil-6-tertbutilhidroindeno
<b>AHDI</b>	<i>Phantolide</i>	6-acetil-1,1,2,3,3,5-hexametildihidroindeno
<b>AHTN</b>	<i>Tonalide</i>	7-acetil-1,1,3,4,4,6-hexametil-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i>	Análisis de varianza
<b>ATII</b>	<i>Traseolide</i>	5-acetil-1,1,2,6-tetrametil-3-isopropil-dihidroindeno
<b>BBP</b>	<i>Butyl bencyl phthalate</i>	Ftalato de butilbencilo
<b>BCF</b>	<i>Bioconcentration factor</i>	Factor de bioconcentración
<b>BFRs</b>	<i>Brominated Flame Retardants</i>	Compuestos ignífugos bromados
<b>CLSA</b>	<i>Closed Loop Stripping Analysis</i>	Análisis en bucle cerrado
<b>CID</b>	<i>Collision Induced Dissociation</i>	Disociación Inducida por colisiones
<b>CW</b>	<i>Carbowax</i>	Carbowax
<b>CW-DVB</b>	<i>Carbowax-divinylbencene</i>	Carbowax-divinilbenceno
<b>CW-TPR</b>	<i>Carbowax-Template resine</i>	Carbowax-Resina templada
<b>DBEP</b>	<i>Di (2-n-butoxiethyl) phthalate</i>	Ftalato de di (2-n-butoxiethyl)
<b>DBP</b>	<i>Di (n-butyl) phthalate</i>	Ftalato de di-n-butilo
<b>2,4-DBP</b>	<i>2,4-Dibromophenol</i>	2,4-Dibromofenol
<b>2,6-DBP</b>	<i>2,6-Dibromophenol</i>	2,6-Dibromofenol
<b>DCHP</b>	<i>Dicyclohexyl phthalate</i>	Ftalato de dicitlohexilo
<b>pp'DDE</b>	<i>DichloroDiphenylethane</i>	Diclorofeniletano
<b>DEEP</b>	<i>Di (etoxuethyl) phthalate</i>	Ftalato de bis (etoxietilo)
<b>DEP</b>	<i>Diethyl phthalate</i>	Ftalato de dietilo
<b>DEHP</b>	<i>Di (2-ethylhexyl) phthalate</i>	Ftalato de di (2-etilhexilo)
<b>DHP</b>	<i>Di (n-hexyl) phthalate</i>	Ftalato de di-n-hexilo
<b>DIBP</b>	<i>Di (isobutyl) phthalate</i>	Ftalato de diisobutilo
<b>DMDCS</b>	<i>Dimethyl dichloro silane</i>	Dimetildiclorosilano
<b>DMEP</b>	<i>Di (metoxyethyl) phthalate</i>	Ftalato de di (metoxietilo)
<b>DMP</b>	<i>Dimetyl phthalate</i>	Ftalato de dimetilo
<b>DMPP</b>	<i>Dimethylethyl phthalate</i>	Ftalato de di (metilpentilo)
<b>DNP</b>	<i>Di (n-nonyl) phthalate</i>	Ftalato de di (n-nonilo)
<b>DOP</b>	<i>Di (n-octyl) phthalate</i>	Ftalato de di (n-octilo)
<b>DPMI</b>	<i>Cashmeran</i>	1,2,3,5,6,7-hexahidro-1,1,2,3,3-pentametil-4,H-inden-4-ona
<b>DSPME</b>	<i>Direct SPME</i>	SPME directa
<b>EC</b>	<i>Capillary Electrophoresis</i>	Electroforesis Capilar
<b>EC<sub>50</sub></b>	<i>Effect Concentration</i>	Concentración con efecto medible en el 50% de la población
<b>ECD</b>	<i>Electron Capture Detector</i>	Detector de captura electrónica
<b>μECD</b>	<i>microElectron Capture Detector</i>	Detector de micro captura electrónica
<b>CNI</b>	<i>Chemical Negative Ionization</i>	Ionización química negativa
<b>EDAR</b>		Estación depuradora de agua residual

<b>EI</b>	<i>Electron Ionization</i>	Ionización electrónica
<b>HRMS</b>	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>	Espectrometría de masas de alta resolución
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i>	Agencia de Protección Medioambiental
<b>FID</b>	<i>Flame Ionization Detector</i>	Detector de ionización de llama
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i>	Cromatografía de gases
<b>HBCD</b>	<i>Hexabromocyclododecane</i>	hexabromociclododecano
<b>HEHP</b>	<i>Hexyl-2-ethylhexyl phthalate</i>	Ftalato de hexil-2-etilhexilo
<b>HHCB</b>	<i>Galaxolide</i>	1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilpentaciclo-(g)-2-benzopirano
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HSSPME</b>	<i>Headspace SPME</i>	SPME en espacio de cabeza
<b>HVPC</b>	<i>High volume production compounds</i>	Compuestos con alto volumen de producción
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>	Agencia Internacional de Investigación contra el Cancer
<b>ICP</b>	<i>Inducted Coupled Plasma</i>	Ionización de plasma
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Unión internacional de química pura y aplicada
<b>LC<sub>50</sub></b>	<i>Letal Concentration</i>	Concentración letal para el 50% de la población
<b>LLE</b>	<i>Liquid-liquid extraction</i>	Extracción líquido-líquido
<b>LOD</b>	<i>Limit of detection</i>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	<i>Limit of quantification</i>	Límite de cuantificación
<b>LRMS</b>	<i>Low Resolución Mass Spectrometry</i>	Espectrometría de masas de baja resolución
<b>LVPC</b>	<i>Low volume production compounds</i>	compuestos con bajo volumen de producción
<b>MA</b>	<i>Musk Ambrette</i>	
<b>MK</b>	<i>Musk Ketone</i>	
<b>MM</b>	<i>Musk Moskene</i>	
<b>MRC</b>		Material de referencia certificado
<b>MT</b>	<i>Musk Tibetene</i>	
<b>MTL</b>	<i>Master Testing List</i>	Lista de sustancias tóxicas
<b>MX</b>	<i>Musk Xylene</i>	
<b>NOEC</b>	<i>No Observed Efect Concentration</i>	Máxima concentración sin efectos significativos
<b>NCA</b>		Norma de calidad ambiental
<b>NRA</b>		Niveles de riesgo ambiental
<b>US OSHA</b>	<i>US Occupational Safety and Health Administration</i>	Administración estadounidense para la Salud y Seguridad Laboral
<b>OSPAR</b>	<i>Comission Oslo-Paris</i>	Comisión Oslo-París
<b>PA</b>	<i>Polyacrilate</i>	Poliacrilato
<b>PAHs</b>	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
<b>PBBs</b>	<i>PolyBrominated Byphenyls</i>	Bifenilos polibromados
<b>PBDD/Fs</b>	<i>PolyBrominated Dibenzo-p-Dioxins</i>	p-dibenzodioxinas y furanos polibromados
<b>PBDEs</b>	<i>PolyBrominated Dyphenyl Ethers</i>	difenil éteres policromados
<b>PBP</b>	<i>Pentabromphenol</i>	Pentabromofenol
<b>PCBs</b>	<i>PolyChlorinated Byphenyls</i>	Bifenilos policlorados
<b>PCPs</b>	<i>Personal Care Products</i>	Productos de limpieza y cuidado personal

<b>PCDDs</b>	<i>PolyChlorinated Dibenzo-p-Dioxins</i>	Policlorodibenzo-p-dioxinas
<b>PDMS</b>	<i>Polydimethylsiloxane</i>	Polidimetilsiloxano
<b>PDMS-CAR</b>	<i>Polydimethylsiloxane-Carboxen</i>	Polidimetilsiloxano-Carboxen
<b>PDMS-DVB</b>	<i>Polydimethylsiloxane-divinylbenzene</i>	Polidimetilsiloxano-divinilbenceno
<b>PE</b>	<i>Polyethylene</i>	Polietileno
<b>PEC</b>	<i>Pernicious Effect Concentration</i>	Concentración con efectos nocivos
<b>PHWE</b>	<i>Pressurized Hot Water Extraction</i>	extracción con agua caliente presurizada
<b>PNEC</b>	<i>Pernicious No Effect Concentration</i>	Concentración son efectos nocivos
<b>PS-DVB</b>	<i>Polyestirene-diviniybencene</i>	Poliestireno-divinilbenceno
<b>PTFE</b>	<i>Polytetrafluoroethane</i>	Politetrafluoroetano
<b>PVC</b>	<i>Poly vinyl chloride</i>	Policloruro de vinilo
<b>RSD</b>	<i>Relative Standard Desviation</i>	Desviación estándar relativa
<b>SDE</b>	<i>Simultaneous Steam-Distillation Solvent Extraction</i>	Método de destilación y extracción simultánea
<b>SFE</b>	<i>Supercritic Fluid Extraction</i>	Extracción con fluidos supercríticos
<b>SIM</b>	<i>Selected Ion Monitoring</i>	Monitorización de ión seleccionado
<b>SPE</b>	<i>Soli Phase Extraction</i>	Extracción en fase sólida
<b>SPME</b>	<i>Solid Phase Microextraction</i>	Microextracción en fase sólida
<b>TBBPA</b>	<i>3,5,3',5'-tetrabromobisphenol A</i>	3,5,3',5'-tetrabromobisfenol A
<b>TBP</b>	<i>2,4,6-tribromophenol</i>	2,4,6-tribromofenol
<b>TCBPA</b>	<i>3,5,3',5'-tetrachlorobisphenol A</i>	3,5,3',5'-tetraclorobisfenol A
<b>TWA</b>	<i>Time Weight Average</i>	Límite de exposición medio
<b>VOCs</b>	<i>Volatic Organic Compounds</i>	Compuestos orgánicos volátiles
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>	Organización Mundial de la Salud



**VI.2. PUBLICACIONES**

En este último apartado se recopilan los artículos publicados de cada uno de los estudios abordados en la memoria de Tesis.





# Optimization of a sensitive method for the determination of nitro musk fragrances in waters by solid-phase microextraction and gas chromatography with micro electron capture detection using factorial experimental design

Maria Polo · Carmen Garcia-Jares ·  
Maria Llompart · Rafael Cela

Received: 23 February 2007 / Revised: 7 May 2007 / Accepted: 10 May 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** A solid-phase microextraction method (SPME) followed by gas chromatography with micro electron capture detection for determining trace levels of nitro musk fragrances in residual waters was optimized. Four nitro musks, musk xylene, musk moskene, musk tibetene and musk ketone, were selected for the optimization of the method. Factors affecting the extraction process were studied using a multivariate approach. Two extraction modes (direct SPME and headspace SPME) were tried at different extraction temperatures using two fiber coatings [Carboxen–polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) and polydimethylsiloxane–divinylbenzene (PDMS/DVB)] selected among five commercial tested fibers. Sample agitation and the salting-out effect were also factors studied. The main effects and interactions between the factors were studied for all the target compounds. An extraction temperature of 100 °C and sampling the headspace over the sample, using either CAR/PDMS or PDMS/DVB as fiber coatings, were found to be the experimental conditions that led to a more effective extraction. High sensitivity, with detection limits in the low nanogram per liter range, and good linearity and repeatability were achieved for all nitro musks. Since the method proposed performed well for real samples, it was applied to different water samples, including wastewater and sewage, in which some of the target compounds (musk xylene and musk ketone) were detected and quantified.

**Keywords** Nitro musk fragrances · Solid-phase microextraction · Gas chromatography–micro electron capture detection · Water analysis · Factorial design

## Introduction

In the last few years, increasing attention has been given to a class of emerging toxic substances like some components of the so-called pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). Numerous products like soaps, detergents, cosmetics and other consumer products are being continuously released into the environment. Since fragrances are constituents of many of these products, their musk components can be characterized by their ubiquity [1]. Three families of musks, nitro musks, polycyclic musks and macrocyclic musks, were developed to substitute the extremely expensive natural musks.

Among the synthetic musk compounds, the nitro musk family includes five members: musk xylene (MX), musk ambrette, musk moskene (MM), musk tibetene (MT), and musk ketone (MK) [2]. In particular, MX and MK are the most widely used nitromusks, mainly in detergents and cosmetics, so their primary method of release into the environment is through discharges of domestic wastewater. Since the time when nitro musk compounds were detected by Yamagishi et al. [3, 4] in marine animals and humans from Japan, MX has no longer been used in that country. Subsequently, MX and MK were mostly detected in Europe in aquatic biota [5–7], as well as in human milk and adipose tissue [8], demonstrating the lipophilic nature and the high bioaccumulation potential of nitro musk compounds. On

M. Polo · C. Garcia-Jares (✉) · M. Llompart · R. Cela  
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,  
Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis  
Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,  
15782 Santiago de Compostela, Spain  
e-mail: qncgj@usc.es

the basis of these findings, and owing to general concern about the environmental fate of nitro musks, their substitution by other compounds, mainly polycyclic musks, was recommended. In 1994, the use of musk ambrette was specifically forbidden in all fragrance products owing to its demonstrated neurotoxic effect [9]. In 1998, MX was included in the third list of contaminants for priority action of the EU and the OSPAR Commission [10]. This musk proved to be carcinogenic in animal studies. MK is suspected of increasing the carcinogenic effects of other substances [11]. Nowadays, polycyclic musks like galaxolide and tonalide form part of most fragrance formulations for household and cosmetic products. However, nitro musks are currently present in about 5% of the products that were not reformulated, and although nitro musks are being phased out in Europe, completion is expected in 2008 [12]. Hence, the environmental persistence of nitro musks associated with their lipophilicity makes the routine monitoring of nitro musks in wastewaters and other environmental samples still necessary today.

Several analytical methods have been developed for the identification and quantification of musk compounds in a variety of environmental samples, but most of them have mainly focused on the analysis of polycyclic musks. In the case of nitro musk compounds, available methods are based on gas chromatography (GC) using electron capture detection [13], or coupled to spectral detection techniques such as mass spectrometry (MS), in the electron ionization mode [7, 14] or in the negative chemical ionization mode [11], and tandem MS [15]; GC–atomic emission spectroscopy has also been used [16].

Several procedures have been reported for the separation of musk compounds depending on the sample matrix. Liquid–liquid extraction has been applied to determine polycyclic and nitro musks in water [17–19], and accelerated solvent extraction [20] and Soxhlet extraction have been used for other more complex environmental samples [14]. Sorbents [6, 21], disks [20], semipermeable membrane devices [22], and closed-loop stripping analysis [23] have also been employed for extraction of musks from water samples. In any case, all approaches based on liquid–liquid extraction and solid-phase extraction imply the use of organic solvents, which constitutes a pollution problem by itself. As an alternative, solid-phase microextraction (SPME) is a solventless technique [24] that has been successfully applied to determine a wide range of water pollutants such as phthalates, polychlorinated biphenyls, brominated flame retardants, and phenolic compounds [25–32], among many others. The high octanol–water partition coefficient ( $K_{ow}$ ) of nitro musks is responsible for their absorption through skin and tissues, as well as for their bioaccumulation in the environment, but it also makes SPME a suitable technique for the extraction of these

compounds from water samples. Nevertheless, very few studies have dealt with the application of SPME to the analysis of nitro musks. Struppe et al. [16] described the use of SPME to determine MX, MK, and musk ambrette in cosmetic products, but to the best of our knowledge, there is still a lack of studies which consider the full optimization of a SPME method with enough sensitivity to determine nitro musks in water samples at environmental concentration levels. This fact may be the consequence of the growing use of polycyclic musks, which are extensively found in waters at concentrations notably higher than those of nitro musks, and thus applications of SPME to musk fragrances in water samples [16, 33–35] did not include nitro musks or included only one or two compounds [34, 35].

In the present paper, a method based on SPME–GC–micro electron capture detection ( $\mu$ ECD) allowing the rapid and very sensitive analysis of nitro musk compounds in water is proposed. The chemical structures and the main physical–chemical properties of the target compounds are summarized in Table 1.

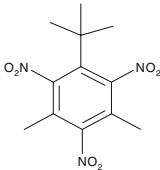
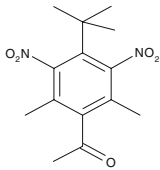
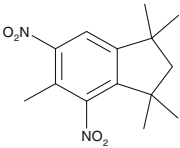
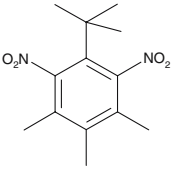
Method optimization was carried out using an experimental design strategy. In this way, all factors were simultaneously considered to find the optimal working conditions with economy of experimental media. In addition, this strategy allowed the study of possible interactions between factors, not detectable with a one-by-one factor-optimization approach. A full discussion on factors that could influence the extraction of MX, MM, MT, and MK is provided. These include the type of fiber coating, extraction temperature, extraction mode, salting-out effect, and sample agitation. After optimization, the method performance is evaluated, and results obtained for linearity, limits of detection, precision, and accuracy are reported. Finally, to demonstrate the feasibility of the SPME method developed, it was applied to real water samples, including wastewater.

## Experimental

### Reagents and materials

MX, MM, MT, and MK were all purchased as individual solutions of 10 mg L<sup>-1</sup> in cyclohexane from Promochem (LGC Desealers, Barcelona, Spain). Cyclohexane, acetone, methanol, and NaCl were all supplied by Merck (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain). All the solvents and reagents were of analytical grade. Standard mixture solutions of the nitro musk compounds were obtained by appropriate dilutions in cyclohexane and acetone, and were stored in amber glass vials in the dark at -20 °C. Spiked water solutions were prepared by adding different volumes of acetone solutions of the target analytes. Real samples, tap water, wastewaters, and raw sewage samples were used.

**Table 1** Identification and physical–chemical properties of the target nitro musks

Compound	CAS No	Chemical structure	Solubility (mg/L)	log K <sub>ow</sub>	Henry's Constant (atm.L/mol)
Musk xylene (MX), 1-tert-butyl-3,5-dimethyl- 2,4,6-trinitrobenzene	81-15-2		0.15	4.9	7.73x10 <sup>-6</sup>
Musk ketone (MK), 2,6-dimethyl-3,5-dinitro-4- tert-acetophenone	81-14-1		0.46	4.3	1.90x10 <sup>-6</sup>
Musk moskene (MM), 4,6-dinitro-1,1,3,3,5- pentamethyl indane	116-66-5		0.046	5.3	1.54x10 <sup>-4</sup>
Musk tibetene (MT), 1-tert-butyl-2,6-dinitro-3,4,5- trimethylbenzene	145-39-1		0.052	5.0	9.96x10 <sup>-4</sup>

Tap water samples were collected from the water supply of our laboratory. Flow-proportional 12-h composite wastewater samples were taken from the influent and from the effluent of a wastewater treatment plant (for a city of 125,000 inhabitants). Raw sewage samples were taken from different city sewers. These samples were stored in the dark at 4 °C until they were analyzed.

The SPME manual holders and fibers were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Five fibers were used: 85 µm polyacrylate (PA), 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS), 75 µm Carboxen–PDMS (CAR/PDMS), 65 µm PDMS–divinylbenzene (PDMS/DVB), and 65 µm Carbowax–DVB (CW/DVB). Before working with the fibers, they were conditioned as recommended by the manufacturer.

#### Experimental set-up

Samples were placed in headspace 22-mL vials. The vials were sealed with a headspace aluminum cap furnished with a Teflon-faced septum and immersed in a water bath maintained at a temperature depending on the actual experiment. Samples were left to equilibrate for 5 min before extraction. Afterwards, the fiber was exposed to the headspace over the sample (or directly immersed into the water sample) for 25 min, depending on the experiment. If agitation was required, a stir bar was introduced into the

vial and magnetic stirring was performed during all the sampling process. Once the exposure period had finished, the fiber was immediately inserted into the GC injection port, and the chromatographic analysis was carried out. The desorption time was set at 2 min although an extra period of 5 min for desorption was considered to avoid a possible carryover effect after the analysis of concentrated samples. The desorption temperatures were 260 °C for CW/DVB, 270 °C for PDMS and PDMS/DVB, and 300 °C for PA and CAR/PDMS. Other experimental parameters were optimized by factorial design, so further discussion about them will be provided in the “[Results and discussion](#).”

In the case of wastewater samples, the samples were filtered through glass filters of 0.45-µm pore size (Millipore, Madrid, Spain), just before the analysis.

#### GC analysis

GC-µECD analysis was performed with an Agilent 6890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a split/splitless injector and a <sup>63</sup>Ni micro-electron capture detector. Musk compounds were separated in an HP-5 30-m long×0.25-mm inner diameter column coated with a 0.25-µm-thick film. The GC oven temperature program was as follows: 60 °C hold for 2 min, 10 °C/min to 250 °C, and 20 °C/min to 280 °C (total analysis time,

23.5 min). Nitrogen (purity 99.999%) was employed as a carrier and make-up gas, with a column initial head pressure of 12 psi, which led to a total column flow of 1 mL min<sup>-1</sup> measured at 60 °C, and a make-up flow of 40 mL min<sup>-1</sup>. The injector was operated in the splitless mode, and was programmed to return to split 2 min after the beginning of a run; its temperature ranged from 260 to 300 °C, depending on the type of fiber coating being desorbed. The detector temperature was maintained at 285 °C.

GC-MS analysis was performed using a Varian 3800 gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) equipped with a Varian Saturn 2000 ion-trap mass detector. The system was operated by Saturn GC-MS Workstation v5.4 software. Separation of the analytes was performed in a Varian CP-Sil8 CB Low-bleed/MS 25-m long×0.25-mm inner diameter column coated with a 0.25-μm-thick film. The GC oven temperature program was the same as employed in the GC-μECD analyses. Helium (purity 99.999%) was employed as a carrier gas, with a constant column flow of 1 mL min<sup>-1</sup>. The injector was operated in the splitless mode (2 min) at a temperature between 260 and 300 °C, depending on the fiber used. The ion-trap mass spectrometer was operated in the electron ionization mode (70 eV) with an acquisition mass range from 100 to 300 *m/z*. The experimental parameters for ionization were as follows: multiplier voltage, 1,800 V; filament emission current, 15 μA; axial modulation voltage, 4 V; ionization control, automatic mode; filament/multiplier delay, 4 min. Trap, manifold, and transfer line temperatures were 220, 50 and 290 °C, respectively.

**Table 2** Retention time and selected ions for the analysis of the target nitro musks

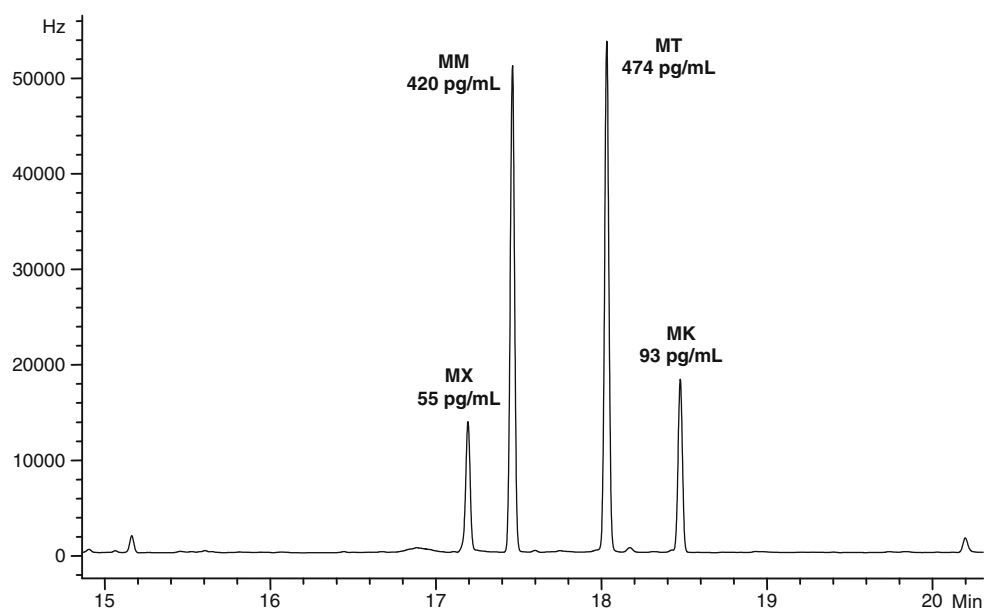
Compound	Retention time (min)	Identification ions ( <i>m/z</i> )	Quantification ions ( <i>m/z</i> )
Musk xylene	17.19	282, 283, 297	282
Musk moskene	17.46	263, 264, 278	263
Musk tibetene	18.03	251, 252, 266	251
Musk ketone	18.48	279, 280, 294	279

## Results and discussion

The first experiments were conducted to achieve good chromatographic separation of the target nitro musks. The determination of these compounds was performed by GC-μECD because of its sensitivity and selectivity for structures containing nitro groups. GC-MS was used to ensure the correct identification of nitro musks and to confirm μECD results on the basis of mass spectra and retention parameters. Mass spectra were obtained that allowed the selection of the most suitable ions for their identification ( $M^+$  and  $[M-CH_3]^+$ ) and quantification ( $[M-CH_3]^+$ ) in water samples (Table 2).

Figure 1 shows the GC-μECD chromatogram of a Milli-Q water solution spiked with the analytes at the nanogram per liter concentration level, and sampled in the headspace mode at 100 °C with a CAR/PDMS fiber.

**Fig. 1** Gas chromatography–micro electron capture detection (GC-μECD) chromatogram of an ultrapure water sample spiked with the target nitro musks. *MK* musk ketone, *MM* musk moskene, *MT* musk tibetene, *MX* musk xylene



Factorial design: study of the influence of temperature, fiber coating, extraction mode, agitation, and salting out on SPME efficiency

A factorial design was run to simultaneously study the main factors affecting the microextraction process. Five experimental factors were considered. The factors (and levels) included in the design were as follows: (1) extraction temperature (25, 60, and 100 °C); (2) fiber coating (PDMS/DVB and CAR/PDMS); (3) extraction mode (direct SPME and headspace SPME); (4) agitation of samples (no, yes); and (5) the salting-out effect (0 and 20% w/v NaCl).

Before the multivariate optimization, some experiments were carried out to test five commercial fibers (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS, PA, CW/DVB) using aliquots of 10 mL of spiked water in 22-mL vials extracted under the same experimental conditions (headspace, 100 °C) for 25 min. These experiments were performed in duplicate and the data were subjected to a one-factor analysis of variance to determine the statistical significance of the differences observed between fibers. From the results (data not shown), it could be concluded that the efficiency obtained with each of the fibers tested could be considered statistically different for all compounds, with the exception of MT. Figure 2 shows the comparison of the average responses obtained for each musk using the five fibers. The intervals displayed are 95.0% confidence intervals of the mean. As can be seen, the extraction efficiency of PDMS/DVB and CAR/PDMS is higher than that shown by the other fibers, and so these two fibers were the ones kept for the experimental design.

A mixed level fraction  $3 \times 2^{4-2}$  type IV resolution design, which involved 12 runs, was selected [36]. In this design, the main effects are clear from two-factor interactions, but these last ones are partially confounded with other two-factor-interaction effects. Considering that one of the objectives of this work is the development of a method that uses a small volume of sample and generates the minimum amount of residues, the design experiments were performed by sampling aliquots of 10 mL water samples

spiked at the nanogram per liter concentration level in 22-mL vials. Table 3 shows the resulting matrix of experiments. The analysis of the results obtained after running the 12 experiments produced the standardized Pareto charts shown in Fig. 3, in which factors and interactions that exhibited the lowest effects on the results obtained for each nitro musk have been removed. The length of each bar in the graphs is proportional to the absolute value of its associated standardized effect. It was obtained by dividing the estimated effect of each factor or sum of interactions by its standard error. The effects are displayed in decreasing order of importance, which allows easy identification of the most important factors. Figure 4 shows plots of the main effects, in which the effect of each factor is shown by a line drawn between the low and the high level for the corresponding factor. The magnitude of the effect on the microextraction process can be appreciated on the basis of the length of the lines, and the level of the factor that produces a higher response is evident from the sign of the slope.

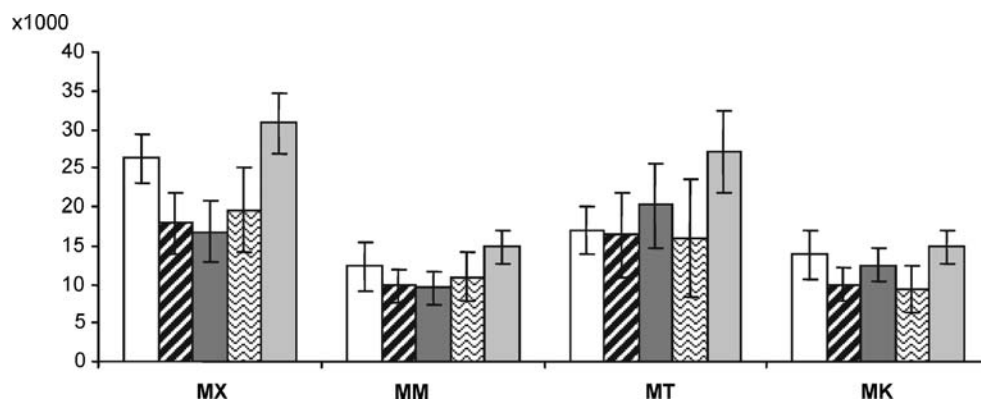
As can be seen in Figs. 3 and 4, temperature was the most important factor for the extraction of all analytes. This factor was the only one studied at three levels, and the plot of the main effects shows an optimum experimental setting at the highest level (100 °C) of this factor for all compounds.

The factor fiber was not significant for any compound. As can be seen in Fig. 4, for MX and MM, both fibers tested showed similar performance, while for MT and MK, the positive slope and the length of the lines mean that the CAR/PDMS fiber was slightly more efficient for these two compounds.

The extraction mode was also significant for most of the compounds and the best results were attained by working at a high level of this factor, which means sampling in the headspace mode, for most compounds. From Fig. 4, the extraction mode seems to be not significant for the extraction of MK.

The agitation of the sample was also an important factor for most of the target musks, especially for MK, although

**Fig. 2** Comparison of the headspace solid-phase microextraction efficiency using five different commercial fibers (responses are the mean for each fiber expressed as area counts): bars from left to right Carboxen–polydimethylsiloxane, Carbowax–divinylbenzene, polyacrylate, polydimethylsiloxane, and polydimethylsiloxane–divinylbenzene





**Table 3** Matrix of the mixed level fraction  $3 \times 2^{4-2}$  factorial design

Run	Temperature (°C)	Fiber	Extraction mode	Agitation	NaCl (%)
1	25	CAR/PDMS	HSSPME	Yes	0
2	62.5	PDMS/DVB	HSSPME	No	0
3	100	CAR/PDMS	HSSPME	Yes	0
4	100	PDMS/DVB	DSPME	No	20
5	25	CAR/PDMS	DSPME	No	0
6	62.5	PDMS/DVB	DSPME	Yes	0
7	100	CAR/PDMS	DSPME	No	0
8	100	PDMS/DVB	HSSPME	Yes	20
9	62.5	CAR/PDMS	HSSPME	No	20
10	25	PDMS/DVB	HSSPME	Yes	20
11	25	PDMS/DVB	DSPME	No	20
12	62.5	CAR/PDMS	DSPME	Yes	20

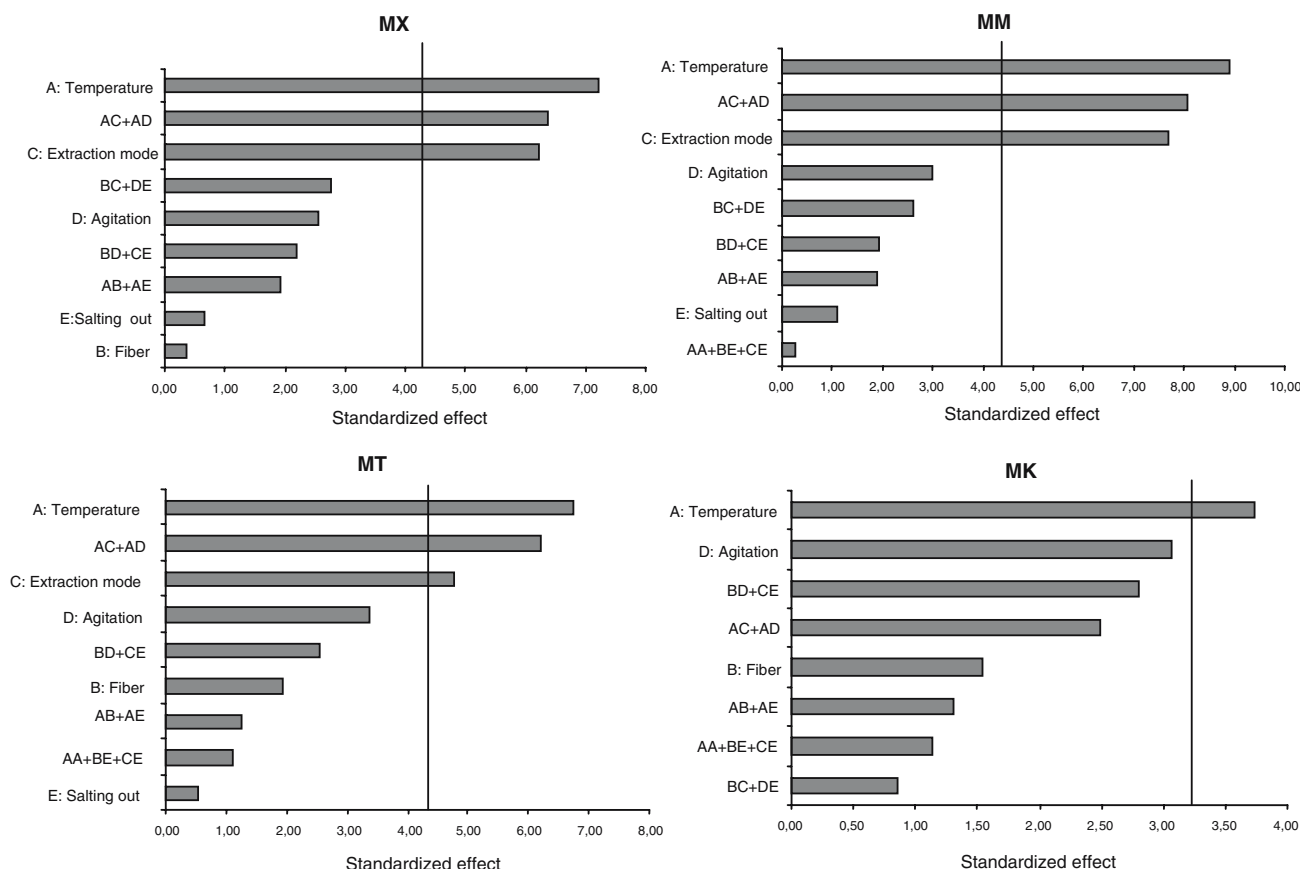
CAR Carboxen, DVB divinylbenzene, PDMS polydimethylsiloxane, DSPME direct solid-phase microextraction, HSSPME headspace solid-phase microextraction

this factor did not reach the significant level in any case (Fig. 3). Speeding up mass transfer leads to a shortening of equilibrium times, but it does not have an effect if compound extraction is done in equilibrium conditions [24]. The positive slope of the lines representing this factor, as shown in Fig. 4, indicates that extraction is favored by sample stirring, and so, at the selected extraction time

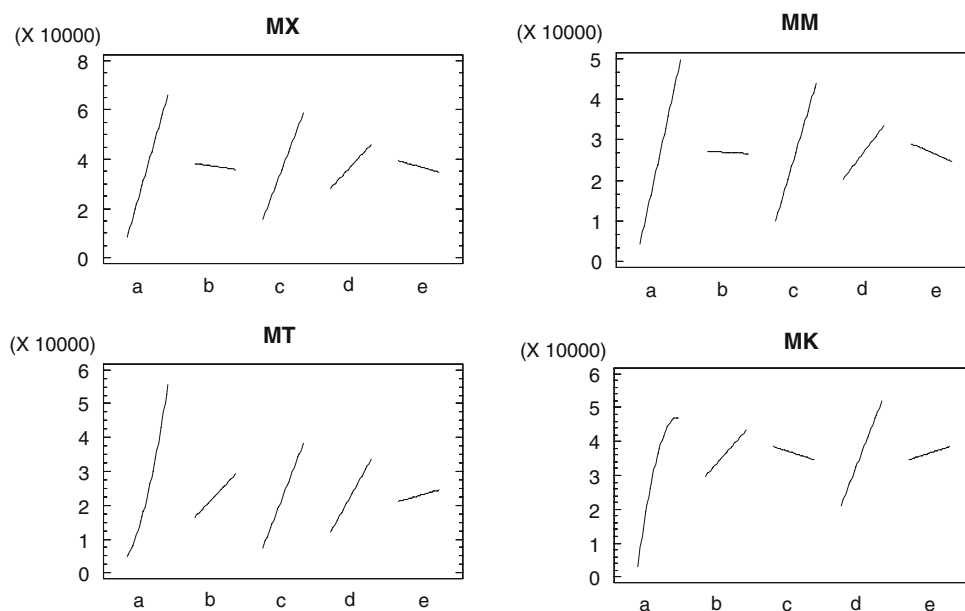
(25 min), the SPME of the target compounds is under kinetic conditions.

The salting-out effect was not significant for any compound. As can be seen in Fig. 3, the slope of the lines representing the factor indicates that the addition of salt had only a very slight effect on the extraction of nitro musks.

Regarding factor interactions, Fig. 3 shows that the most interesting one was the interaction between temperature and

**Fig. 3** Standardized Pareto charts for the main effects and interactions

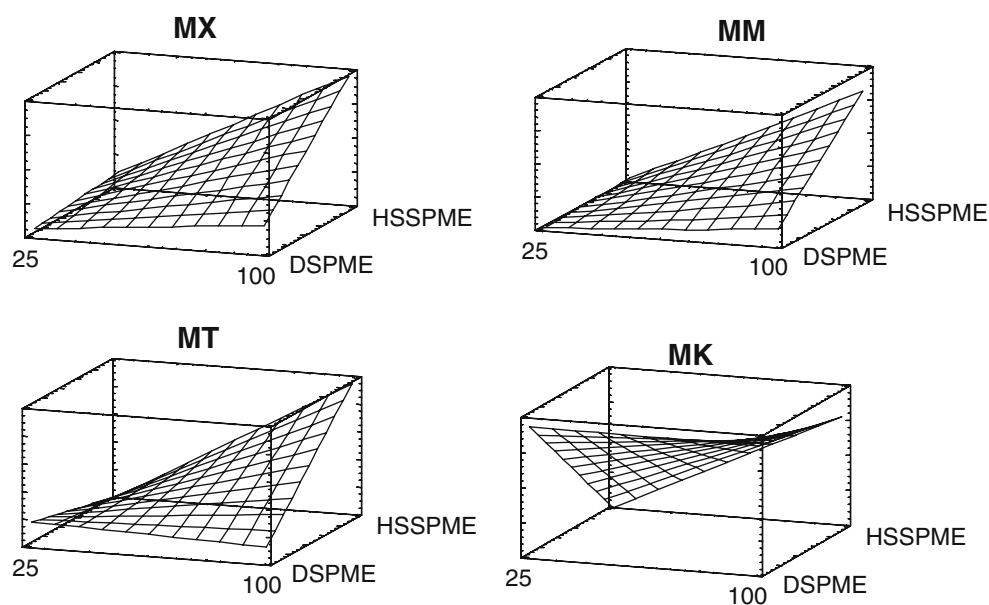
**Fig. 4** Influence of the main effects on the extraction of the target nitro musks: temperature (a), fiber (b), extraction mode (c), agitation (d), and salting out (e). Responses are given as area counts



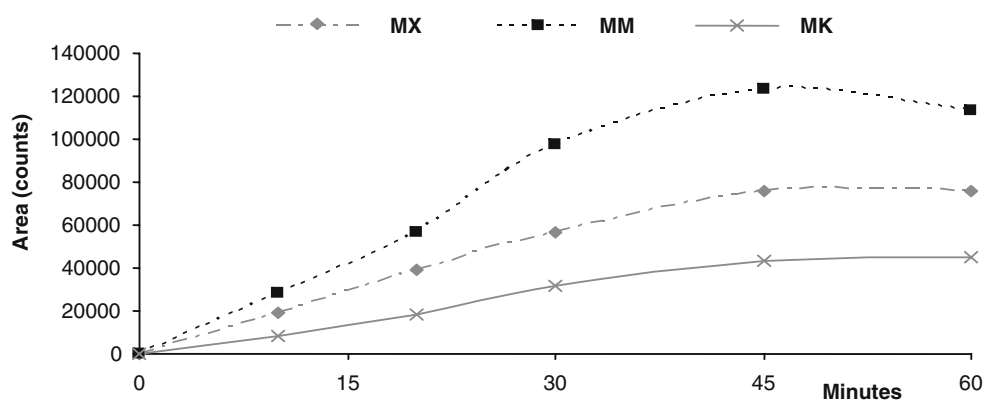
extraction mode (AC), which appeared confounded by interaction between temperature and agitation (AD). Pareto charts indicate that these interactions were significant for three of the target compounds. The estimated response surfaces for the factors temperature and extraction mode are shown in Fig. 5. For MX, MM, and MT, the direct SPME response was lower than the headspace SPME response at any temperature, but a noticeable increment in headspace efficiency was observed at 100 °C, so the maximum response is attained under these conditions. However, the direct SPME response for MK was higher at 25 °C than at 100 °C, and was much higher than the headspace SPME response at 25 °C, although the improvement in headspace SPME efficiency observed with temperature meant that at

100 °C both extraction modes were comparable in terms of efficiency. The fact that MK can be efficiently extracted in the headspace mode might appear unexpected since this compound can be considered nonvolatile from its low vapor pressure and from the value of its Henry's law constant (Table 1) [34]. Nevertheless, the same behavior has been described for other compounds, such as PCBs, polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers, which are considered semivolatile or nonvolatile species on the basis of the values of their Henry's law constants [28, 31]. Working with headspace SPME provides several advantages over direct SPME extraction modes. Among them, headspace SPME allows the extension of the operative lifetime of the fiber, preventing possible damage

**Fig. 5** Estimated response surfaces (in area counts) for the factors temperature and extraction mode for the target nitro musks. *DSPME* direct solid-phase microextraction, *HSSPME* headspace solid-phase microextraction



**Fig. 6** Extraction time profiles at 100 °C sampling headspace (response in are counts)



from complex matrices, as well as minimizing interferences from undesirable species.

Since the optimal values for each factor considered were similar, a general SPME method can be established for the analysis of nitro musks. Sampling the headspace at 100 °C was selected as the best condition for the significant factors extraction mode and temperature, since these levels were clearly the optima for all target compounds. Besides, an improvement in extraction was observed by stirring the samples, so sample agitation is proposed. Regarding fiber selection, both PDMS/DVB and CAR/PDMS fibers would be suitable for the extraction of nitro musk compounds, but according to previous discussion on the slightly better results obtained with CAR/PDMS fiber for MT and MK, this last fiber was employed for method performance. From the results obtained, salt addition was discarded.

The effect of the extraction time on the response was evaluated by analyzing spiked water samples after 0, 10, 20, 45 and 60 min of headspace sampling using a CAR/PDMS fiber. Figure 6 shows the extraction time profiles for MX, MM, and MK. As can be seen, all compounds reached the equilibrium condition in 45 min. However, the extraction

time was finally set at 25 min since the sensitivity of the response was high enough to propose a rapid extraction method according to the chromatographic run time.

#### Study of performance and application to real samples

To evaluate the linearity of the SPME method, a calibration study was performed in duplicate at six levels of concentration in the range from 5 to 1,000 ng L<sup>-1</sup> (1–1,000 ng L<sup>-1</sup> for MX). Coefficients of determination ( $R^2$ ) are given in Table 4. Since they were equal to or higher than 0.997, a directly proportional relationship between the amount of compound extracted and its initial concentration in the sample was demonstrated.

The precision of the experimental procedure was evaluated at two concentration levels (50 and 500 ng L<sup>-1</sup>) by calculating the relative standard deviation (RSD) of three replicates for each level. The results are also shown in Table 4. The RSD values ranged from 2.4 to 11% for the low concentration level, and from 4.0 to 9.4% for the high level.

**Table 4** Linearity, repeatability, recovery, limits of detection (LOD), and limits of quantification (LOQ) of the proposed headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–micro electron capture detection method

Compound	Coefficient of determination ( $R^2$ )	Repeatability (RSD %, $n=3$ )		Recovery±RSD (%)			LOD (ng L <sup>-1</sup> ) (S/N=3)	LOQ (ng L <sup>-1</sup> ) (S/N=10)
		50 ng L <sup>-1</sup>	500 ng L <sup>-1</sup>	Tap water ( $n=3$ )	Effluent wastewater ( $n=3$ )	Influent wastewater ( $n=3$ )		
Musk xylene	0.9991	2.4	4.0	106±3	108±8	96±4	0.25	0.83
Musk moskene	0.9994	3.7	9.4	96±4	96±9	92±8	1.82	6.07
Musk tibetene	0.9973	3.6	6.8	103±4	108±11	102±12	3.60	12.0
Musk ketone	0.9984	11	7.9	84±10	105±7	96±9	1.05	3.50

RSD relative standard deviation



**Table 5** Concentration of the nitro musk compounds found in environmental contaminated samples

Compounds	Concentration (ng L <sup>-1</sup> )					
	Effluent (n=2)	Influent (n=3)	Raw water 1 (n=2)	Raw water 2 (n=2)	Raw water 3 (n=2)	Raw water 4 (n=2)
Musk xylene	2.4	7.1±0.8	9.3	15	6.2	13
Musk moskene	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Musk tibetene	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Musk ketone	<LOQ	3.8±0.4	5.8	<LOQ	4.3	6.3

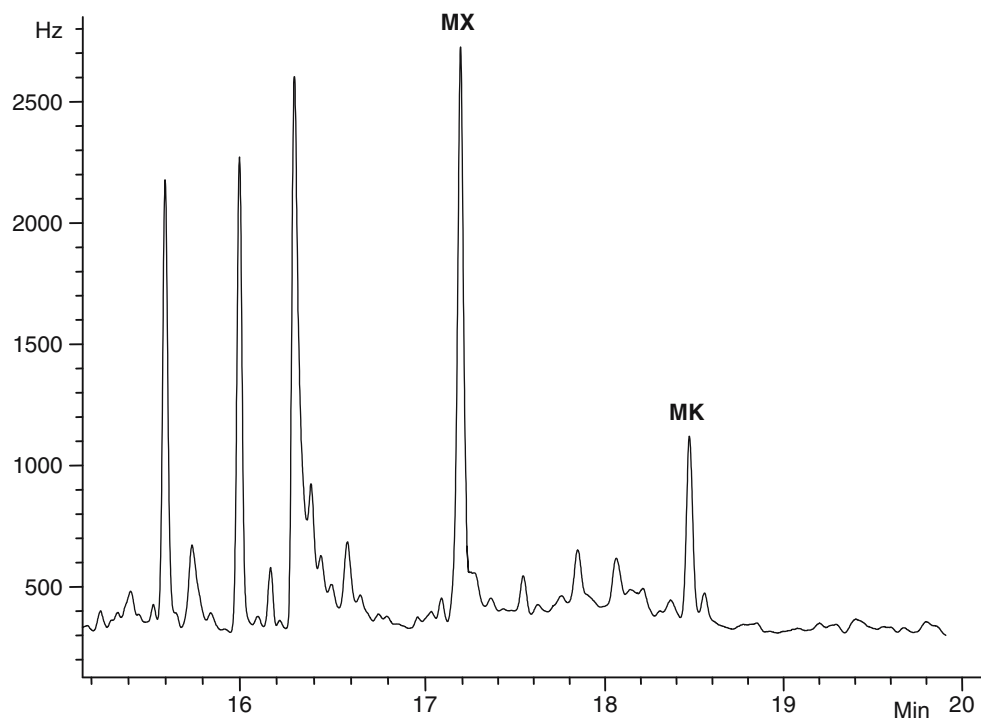
ND not detected

To evaluate the detection limits of the method, it is necessary to have proper water blanks to establish the background of the method. The risk of sample contamination with nitro musks appears to be less than with other musk compounds like galaxolide and tonalide, which are widely present in large amounts in many cosmetic and household product formulations. Nevertheless, the possible sample contamination should not be undervalued, and precautions to minimize sources of interference in the laboratory environment should be stressed. To avoid water sample contamination through handling, dedicated glassware and nitrile powderless hand gloves were used during sample treatment. In addition, analysts did not use perfumes or personal care products containing fragrances. The limits of detection (based on a signal-to-noise ratio of 3) are shown in Table 4 and ranged between 0.25 and 3.6 ng L<sup>-1</sup>. These limits of detection are comparable to those found in recent literature [23], underlining the high sensitivity of the proposed SPME-GC- $\mu$ ECD method. Limits of quantifica-

tion (based on a signal-to-noise ratio of 10) are also included in Table 4.

In addition, the feasibility of the method was demonstrated with real samples. The optimized method was applied to analyze tap water, as well as the effluent and influent wastewaters obtained from an urban sewage treatment plant. Headspace SPME analyses of unspiked tap water did not show initial detectable concentrations of the target compounds, but trace levels of MX and MK were detected in effluent and influent wastewater samples. Then, tap water was spiked with the compounds at 50 ng L<sup>-1</sup>, effluent wastewater at 200 ng L<sup>-1</sup>, and influent wastewater, which was the most complex sample, at 500 ng L<sup>-1</sup>. Fortified samples were analyzed by the proposed method using external calibration. In the case of the wastewaters, peak areas for MX and MK for the unspiked samples were subtracted from those measured for the spiked ones. Recoveries were then calculated as ratio of the measured concentration to the spiked concentration and were expressed as a

**Fig. 7** GC- $\mu$ ECD chromatogram of a real contaminated water sample taken from the influent of an urban sewage treatment plant



percentage (Table 4). The amounts of analyte found were in good agreement with the amount of analyte added, showing recoveries from 92 to 108% (84% for MK in tap water), with RSD values ranging from 3 to 12%. Therefore, since no significant matrix effect was found, quantification by external standard calibration was suitable.

Practical applicability of the proposed SPME method was demonstrated through the analysis of complex samples: effluent and influent wastewaters from an urban sewage treatment plant, and raw wastewater from four different city sewers. The results are presented in Table 5. It must be pointed out that only MX and MK, the most widely used nitro musks, were found at concentrations ranging from 2.4 to 15 ng L<sup>-1</sup>. The presence of these fragrances in the samples was confirmed by GC-MS. In all samples, the MX concentration was higher than that of MK, which can be expected from their uses: MX is primarily used in detergents and soaps, while the principal use of MK is in cosmetics. In general, the concentrations of MX and MK found in this study are at the same level as those reported in sewage waters from different European countries [20, 34, 35].

Figure 7 shows the  $\mu$ ECD chromatogram of a wastewater sample where MX and MK were identified.

**Acknowledgements** This research was financially supported by FEDER funds and projects CTQ2006-03334 from the CICYT (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and PGIDIT04P-XIC23701PN from Xunta de Galicia. M.P. would like to acknowledge Xunta de Galicia for her doctoral grant.

## References

- Rimkus GG (1999) *Toxicol Lett* 111:37–56
- Swedish Society for Nature Conservation (2000) *Fragrances 2000. Foundations concerning criteria*. Bra Miljöval, Stockholm
- Yamagishi T, Miyazaki T, Horii S, Kaneko S (1981) *Bull Environ Contam Toxicol* 26:656–662
- Yamagishi T, Miyazaki T, Horii S, Aklyama K (1983) *Arch Environ Contam Toxicol* 12:83–89
- Rimkus GG, Wolf M (1995) *Chemosphere* 30:641–651
- Osemwengie LI, Gerstenberger SL (2004) *J Environ Monit* 6:533–539
- Gateman R, Hühnerfuss H, Rimkus G, Attar A, Kettrup A (1998) *Chemosphere* 36:2535–2547
- Rimkus GG, Rimkus B, Wolf M (1994) *Chemosphere* 28:421–432
- International Fragrance Association (1994) *Code and standards*. International Fragrance Association, Geneva
- European Commission (1997) Commission regulation (EC) no 143/97 of 27 January of 1997 concerning the third list of priority substances as foreseen under Council regulation (EEC) no 793/93 (1997). *Official journal* no L 025, 28.113–114
- Apostolidis S, Chandra T, Demirhan I, Cinalt J, Doerr HW, Chandra A (2002) *Anticancer Res* 22:2657–2662
- OSPAR Commission (2004) *OSPAR background document on musk xylene and other musks*. OSPAR Commission, London
- Wisneski HH (2001) *J AOAC Int* 84:376–381
- Gateman R, Hellou J, Hühnerfuss H, Rimkus G, Zitko V (1999) *Chemosphere* 38:3431–3441
- Herren D, Berset JD (2000) *Chemosphere* 40:565–574
- Struppe C, Schäfer B, Engewald W (1997) *Chromatographia* 45:138–144
- Hajslava J, Gregor P, Chladkova V, Alterova K (1998) *Organohalogen Compd* 39:253–256
- Bester K, Hühnerfuss H, Lange W, Rimkus GG, Theobald N (1998) *Water Res* 32:1857–1863
- Peck AM, Hornbuckle KC (2004) *Environ Sci Technol* 38:367–372
- Simonich SL, Begley WM, Debaere G, Eckhoff WS (2000) *Environ Sci Technol* 34:954–965
- Osemwengie LI, Steinberg S (2001) *J Chromatogr A* 932:107–118
- Gateman R, Biselli S, Hühnerfuss H, Rimkus GG, Hecker M, Karbe L (2002) *Arch Environ Contam Toxicol* 42:437–446
- Mitjans D, Ventura F (2005) *Water Sci Technol* 52:145–150
- Pawliszyn J (1997) *Solid phase microextraction: theory and practice*. Wiley, New York
- Magdic S, Pawliszyn JB (1996) *J Chromatogr A* 723:111–122
- Buchholz KD, Pawliszyn J (1993) *Environ Sci Technol* 27:2844–2848
- Llompert M, Blanco B, Cela R (2000) *J Microcol Sep* 12:25–32
- Landin P, Llompert M, Lourido M, Cela R (2001) *J Microcol Sep* 13:275–284
- Llompert M, Lourido M, Landin P, Garcia-Jares C, Cela R (2002) *J Chromatogr A* 963:137–148
- Polo M, Llompert M, García-Jares C, Cela R (2005) *J Chromatogr A* 1072:63–72
- Polo M, Gómez-Noya G, Quintana JB, Llompert M, García-Jares C, Cela R (2004) *Anal Chem* 76:1054–1062
- Polo M, Gómez-Noya G, Llompert M, García-Jares C, Bollain MH, Cela R (2006) *J Chromatogr A* 1124:11–21
- García-Jares C, Llompert M, Polo M, Salgado C, Macías S, Cela R (2002) *J Chromatogr A* 963:277–285
- Winkler M, Headley JV, Peru KM (2000) *J Chromatogr A* 903:203–210
- Heberer T, Gramer S, Stan HJ (1999) *Acta Hydrochim Hydrobiol* 27:150–156
- Statgraphics-Plus (2003) *Experimental design, appendix C. Manugistics*, Rockville



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 963 (2002) 277–285

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

## Optimisation of a solid-phase microextraction method for synthetic musk compounds in water

Carmen García-Jares\*, María Llompart, María Polo, Carmen Salgado, Susana Macías, Rafael Cela

*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, E-15706 Santiago de Compostela, Spain*

### Abstract

A solid-phase microextraction method (SPME) for determining trace levels of synthetic musk fragrances in residual waters has been developed. Six polycyclic musks (cashmeran, phantolide, celestolide, traseolide, galaxolide and tonalide), and a macrocyclic musk (ambrettolide) have been analysed. A detailed study of the different parameters affecting the extraction process is presented. The main important factors affecting the microextraction process have been studied and optimised by means of a categorical factorial design. Two extraction modes (direct SPME and headspace SPME) were tried at different extraction temperatures using four different fiber coatings [polydimethylsiloxane (PDMS), Carboxen (CAR)–PDMS, PDMS–divinylbenzene (DVB) and Carbowax (CW)–DVB]. An extraction temperature of 100 °C sampling the headspace over the sample using CAR–PDMS or PDMS–DVB as fiber coatings were found to be the experimental conditions that lead to a more effective extraction. The method proposed is very simple and yields high sensitivity, with detection limits in the low pg/ml, good linearity and repeatability for all the target compounds. The total analysis time, including extraction and GC analysis, was only 45 min. The optimised method performed well when it was applied to waste water from an urban treatment plant. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Solid-phase microextraction; Water analysis; Headspace analysis; Factorial design; Musk compounds

### 1. Introduction

Personal care products (PCPs) are composed of a wide variety of active ingredients, including fragrance components. Musks are a class of fragrance ingredient that not only contribute to the distinctive odours of consumer products, but they also serve to maintain the integrity of the product's scent. The natural (animal or botanical) sources of musk compounds have been mostly replaced by synthetic

musks with a variety of chemical structures [1]. Basically, three families of musks, nitromusks, polycyclic musks and macrocyclic musks, may be potentially added to PCPs such as detergents, soaps, perfumes, creams, etc. In recent years, growing environmental presence of musk compounds has attracted the attention of several authors [2–10]. These compounds are not considered among the priority persistent pollutants and long-term toxicity was not fully evaluated. Nevertheless, musk compounds need not be persistent if they are continuously introduced in the environment mainly via the urban wastewater effluents. Due to their lipophilic nature, these compounds are known to bioaccumu-

\*Corresponding author. Tel.: +34-981-563-100; fax: +34-981-595-012.

E-mail address: [qncgj@usc.es](mailto:qncgj@usc.es) (C. García-Jares).

late in fatty tissues similarly to chlorinated pesticides.

Several analytical methods were developed for the identification and quantification of musk compounds in a variety of environmental samples. Most methods are based on gas chromatography (GC) coupled to low-resolution mass spectrometry (MS), working in the electron ionisation mode to achieve accurate and sensitive identification of species.

In spite of the detection technique, several approaches are possible for the extraction of musk compounds depending on the sample matrix. Pressurized liquid extraction (PLE) and liquid–liquid extraction were applied to determine some musks in water, sludge, fish, etc. [5–7]. Solid-phase microextraction (SPME) is a relatively new technique that was successfully applied to determine a wide range of water pollutants such as polychlorinated biphenyls (PCBs) or phenols [11–13]. For the analysis of musk compounds in water samples, SPME was recently proposed as an extraction technique due to its inherent advantages [9,14]. In these studies, SPME is performed by directly immersing the fiber into the liquid sample. However, when direct SPME is applied to waste waters, several problems may arise such as irreversible adsorption of major components leading to fiber deterioration.

The aim of the present paper is to provide a method based on SPME–GC–MS that rapidly permits the analysis of synthetic musk compounds in water. Full discussion on the factors influencing the extraction of seven synthetic musk compounds (including one macrocyclic compound) most used as ingredients of PCPs in Spain is also provided. Among these factors, temperature, sampling type or fiber type have been extensively studied. Optimisation was performed by means of experimental design. Data for linearity, precision, and accuracy are provided for the method. Limits of detection (LODs) and quantification (LOQS) were found at the ppt level.

## 2. Experimental section

### 2.1. Reagents and materials

The musk compounds, 6,7-dihydro-1,1,2,3,3-

pentamethyl-4-(5H)-indanon (cashmeran, DPML, [33704-61-9]), 4-acetyl-1,1-dimethyl-6-*tert*-butylindan (celestolide, ADBI, [13171-00-1]), 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4, 6, 6, 7, 8, 8-hexamethylcyclopenta[*g*]-2-benzopyran (galaxolide, HHCB, [1222-05-5]), 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyltetralin (tonalide, AHTN, 1506-02-1]), oxacycloheptadec-10-en-2-one (ambrettolide, [28645-51-4]) were kindly supplied by Ventós (Cornella de Llobregat, Barcelona, Spain); 6-acetyl-1,1,2,3,3,5-hexamethylindan (phantolide, AHMI, [15323-35-0]), 5-acetyl-1,1,2,6-tetramethyl-3-isopropylindan (traseolide, ATII, [68140-48-7]), were supplied by Promochem Iberia (Barcelona, Spain). Isooctane, acetone, methanol, NaCl, were all purchased from Merck (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain). All the solvents and reagents were analytical grade. The SPME manual holders and fibers were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). In this work four fibers were used: 85  $\mu$ m polyacrylate (PA), 100  $\mu$ m polydimethylsiloxane (PDMS), 75  $\mu$ m Carboxen–polydimethylsiloxane (CAR–PDMS), 65  $\mu$ m polydimethylsiloxane–divinylbenzene (PDMS–DVB) and 65  $\mu$ m Carbowax–divinylbenzene (CW–DVB). The fibers were conditioned as recommended by the manufacturer.

### 2.2. Experimental set-up

The samples were placed in headspace vials which total volume depending upon the experiment performed. Vials were sealed with a headspace aluminium cap furnished with a PTFE-faced septum and immersed in a water bath maintained at 100 °C. Samples were let to equilibrate for 5 min before SPME. Afterwards, the fiber was exposed to the headspace over the sample (or immersed into the sample) for 25 min, depending on the experiment. Once finished the exposition period, the fiber was immediately inserted into the GC injector and the chromatographic analysis was carried out. Desorption time was set at 2 min although an extra period of 5 min for desorption was considered to avoid carryover effect after the analysis of more concentrated samples. As some of the experimental parameters were optimised by factorial design, further discussion about them will be furnished in subsequent sections.

### 2.3. Gas chromatography–mass spectrometry

GC–MS analysis were performed in a Varian 3400 CX chromatograph equipped with a Saturn 3 ion trap mass detector and a split/splitless injector, operated by Saturn version 5.4 software. Musk compounds were separated on a 25 m×0.25 mm I.D., Varian VA-5MS column coated with a 0.25 µm film. The GC oven temperature program was: 60 °C hold 2 min, rate 10 °C/min to 250 °C, rate 20 °C/min to final temperature 280 °C hold for 4.5 min (total analysis time, 27 min). Helium was employed as carrier gas, with a column initial head pressure of 8 p.s.i. (1 p.s.i.=6894.76 Pa). Injector was operated in the splitless mode for 2 min and its temperature was set at 250 or 270 °C (depending on the type of fiber coating being desorbed). Transfer line temperature was maintained at 280 °C. The ion-trap mass spectrometer was operated in the electron ionisation mode (70 eV), and the trap temperature was set at 230 °C. Other experimental parameters influencing the acquisition and analysis of mass spectra were the following: full scan mass acquisition range, 35–300 amu; scan rate, 1 s/scan; multiplier voltage, 2100 V; axial modulation voltage, 4 V; filament emission current, 23 µA; ionisation control, automatic mode; filament/multiplier delay, 12 min.

### 3. Results and discussion

The first experiments were conducted to achieve good chromatographic separation of the target analytes. The mass spectrum for each musk compound was also obtained at the experimental conditions, and the most adequate ions for quantification were selected. In Table 1, the retention times at the optimised chromatographic conditions are shown, as well as the quantification and identification ions. It must be noticed that the quantification ion is not always the base peak of the mass spectrum. The criteria followed in the selection of quantification ions were (1) maximum sensibility, (2) minimum possible interference of fragments from other sample components. Fig. 1 shows the mass chromatograms of a 500 pg/ml standard solution containing the seven musks.

Due to their occurrence as ingredients of all kind

Table 1

Retention times and selected ions for the analysis of the target musk compounds

Compound	Retention time (min)	Quantification ion	Identification ion
Cashmeran	13.89	163	191.206
Celestolide	16.46	229	173.244
Phantolide	16.96	229	244.187
Traseolide	17.96	215	173.258
Galaxolide	18.04	213	243.258
Tonalide	18.11	159	187.243
Ambrettolide	19.03	109	67.81

of cleansing products and cosmetics, the risk of sample contamination with musks when they are manipulated in the laboratory is not negligible, so it is advisable to extreme precautions to avoid sources of interference in the laboratory environment. In fact, galaxolide and tonalide were found in blanks of unspiked reagent water analysed at the beginning of the work. To avoid sample contamination, appropriate steps should be emphasised.

#### 3.1. Factorial design

Once the chromatographic conditions were selected, a factorial design was run to evaluate the main parameters affecting the extraction efficiency. For this study, 10 ml water samples in 22 ml vials were spiked with a standard solution of the musks in acetone to give a final concentration of 10 ng/ml. Samples were not stirred during extraction and the exposition time was 25 min. Three parameters were studied in this design: the type of fiber coating, the extraction mode and the temperature. Four different fibers were used in this study: PDMS, PDMS–DVB, CAR–PDMS and CW–DVB. PA fiber was not included in this design because earlier investigations showed poor musk extraction efficiencies. The extraction mode was studied at two levels: direct sampling (SPME) and headspace sampling (HS–SPME). The extraction temperature was tested at three levels (25, 60 and 100 °C).

A multifactor categorical 4\*3\*2 type V resolution design, which involves 24 runs, was selected [15]. This design enables the study of the main effects and two-factor interactions. The analysis of the data obtained led to the analysis of variance (ANOVA)

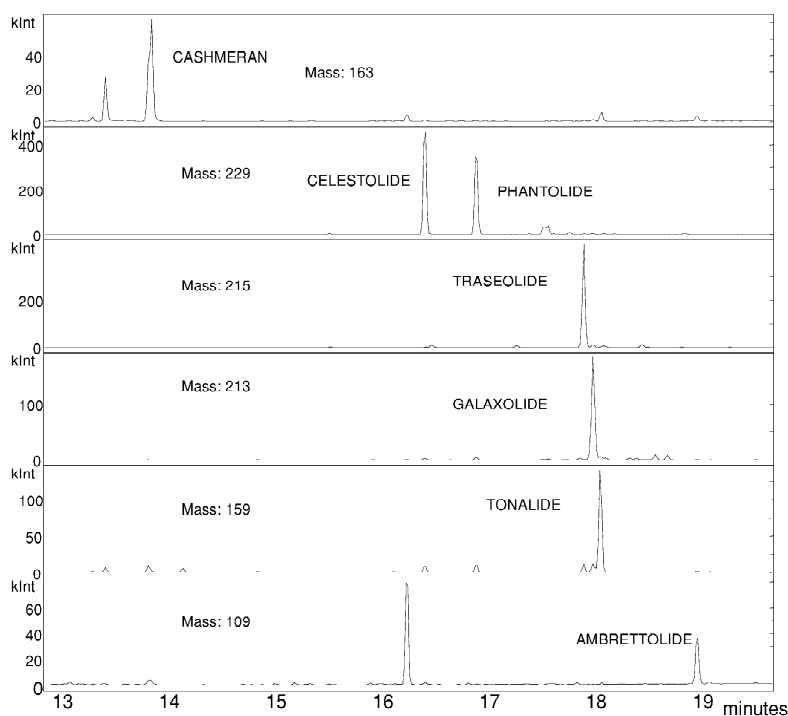


Fig. 1. GC-MS selected ion chromatograms for a water sample containing 500 pg/ml of each musk compound.

results shown in Table 2. In this table, and for the sake of simplicity, only the  $F$ - and  $P$ -values are given. The  $P$ -values test the statistical significance of each of the factors. When  $P$ -value is less than 0.05,

the factor has a statistically significant effect at the 95% confidence level. As can be seen, temperature (B) and extraction mode (C) were found to be significant, as well as the interaction between these

Table 2  
ANOVA results showing the significance of main effects and interactions

Compound	Source	Main effects			Interactions		
		A: Fiber	B: Temperature	C: Extraction mode	AB	AC	BC
Cashmeran	$F$ -ratio	5.46	4.19	2.83	1.01	0.37	3.46
	$P$ -value	0.04	0.07	0.14	0.49	0.78	0.10
Celestolide	$F$ -ratio	4.66	14.96	20.27	1.62	1.60	8.90
	$P$ -value	0.05	0.00	0.00	0.29	0.29	0.02
Phantolide	$F$ -ratio	5.00	17.05	13.79	1.85	1.21	9.58
	$P$ -value	0.05	0.00	0.01	0.24	0.38	0.01
Traseolide	$F$ -ratio	3.78	26.55	30.88	1.58	1.91	14.27
	$P$ -value	0.08	0.00	0.00	0.30	0.23	0.01
Galaxolide	$F$ -ratio	3.73	23.28	22.16	1.47	1.32	12.73
	$P$ -value	0.08	0.00	0.00	0.33	0.35	0.01
Tonalide	$F$ -ratio	4.06	27.64	21.18	1.73	1.62	14.54
	$P$ -value	0.07	0.00	0.00	0.26	0.28	0.01
Ambrettolide	$F$ -ratio	2.91	41.07	62.70	1.58	2.17	2.68
	$P$ -value	0.12	0.00	0.00	0.30	0.19	0.00

Factors are significant when  $P$ -value < 0.05.

two factors (BC) for all the compounds, with the exception of cashmeran. Surprisingly, the factor fiber (A) was only significant for cashmeran, celestolide and phantolide. Nevertheless, with the exception of ambrettolide this main effect was quite close to the significance level for the other musks.

Table 3 shows the interaction of factors fiber and temperature on the response for the target compounds. It must be pointed out that for all the compounds, the best responses were achieved working at the highest temperature (100 °C) for all of the fibers, with the exception of cashmeran. The lowest responses were attained when working at 25 °C. CAR–PDMS and DVB–PDMS fibers gave the best extraction efficiencies at 100 °C. For cashmeran, the maximum extraction was obtained at two different experimental conditions: at 60 °C with CAR–PDMS and at 100 °C with DVB–PDMS. Considering that 100 °C was the best extraction temperature for the other musks, this temperature was selected as the optimum value.

In Table 4, the interaction of fiber and extraction mode on the extraction efficiency was considered for the analytes. HS-SPME is more efficient than direct

SPME for all of the fibers. Table 5 shows the results of the interaction temperature–extraction mode for the compounds. In this table, the significant interaction between the two factors can be seen. At 25 °C, the extraction efficiency is higher when direct SPME is performed, but at higher temperatures (60 or 100 °C) just the opposite occurs; the efficiency of HS-SPME is significantly higher.

For all the compounds considered, response increased as temperature increased both with direct SPME and with HS-SPME. The only exception was cashmeran, for which a decreasing response was evident at 100 °C. Moreover, in direct SPME the extraction efficiency at 100 °C is worse than at 25 °C for this compound.

After analysing all these data, a general method can be established for the extraction of musks in water. The method uses HS-SPME at 100 °C with CAR–PDMS or PDMS–DVB fiber and 10 ml sample.

### 3.2. Evaluation of other experimental parameters

Other factors not included in the design have been

Table 3  
Fiber–temperature interaction (results are expressed as area counts)

Compound	Temperature (°C)	Fiber			
		PDMS	PDMS–DVB	CAR–PDMS	CW–DVB
Cashmeran	25	32679	62328	44013	23563
	60	63616	126071	170524	48440
	100	29174	149206	96562	31146
Celestolide	25	45717	51480	41828	32557
	60	154389	161019	271358	111846
	100	151568	310054	350482	101434
Phantolide	25	33265	38973	33070	24154
	60	104704	108494	180766	79007
	100	101798	229550	248453	82076
Traseolide	25	25342	23738	21576	18543
	60	83487	86946	141984	69550
	100	132579	212117	227139	88867
Galaxolide	25	41334	44138	36627	26517
	60	139360	137349	209723	98237
	100	193851	308000	275996	112199
Tonalide	25	40321	39804	35094	27456
	60	125865	120803	196292	95586
	100	188307	309831	330675	128669
Ambrettolide	25	44486	29553	27449	29252
	60	129765	132526	167689	106393
	100	207981	272988	242300	124828

Table 4  
Fiber–extraction mode interaction (results are expressed as area counts)

Compound	Extraction mode	Fiber			
		PDMS	PDMS–DVB	CAR–PDMS	CW–DVB
Cashmeran	HS	67271	143104	111686	44826
	Direct	32214	81966	95713	23939
Celestolide	HS	157076	264813	320323	108946
	Direct	77373	83556	122122	54945
Phantolide	HS	99571	179302	206293	76426
	Direct	60274	72043	101900	47065
Traseolide	HS	110208	168553	195945	80505
	Direct	50730	46648	64521	37467
Galaxolide	HS	163384	242351	242335	102956
	Direct	86311	83974	105896	55011
Tonalide	HS	149772	232641	263371	106404
	Direct	86556	80984	111335	61403
Ambrettolide	HS	179792	232411	226174	123290
	Direct	75029	57634	65451	50359

considered: sample volume, agitation, salting-out and carryover.

Sample volume can increase the total amount of musks extracted by the fiber. To check the effect of sample volume on the amount of musks extracted by the HS-SPME method, a set of experiments was carried out using the PDMS–DVB fiber. Samples of 10, 30, 60 and 100 ml were introduced in 120 ml vials and HS-SPME was carried out. As can be seen in Table 6, increasing the volume led to higher responses for all the target compounds [16]. Thus, a

sample volume of 100 ml is recommended for analysis requiring high sensitivity.

The possible influence of agitation on the efficiency when HS-SPME is performed was also evaluated by exposing the PDMS–DVB fiber to the headspace of magnetically stirred samples. Results showed that extraction efficiency was not affected by stirring.

Salting-out was evaluated analysing water samples without salt and with 20% NaCl in the HS-SPME mode. No differences in response were found in these experiments.

Carryover was evaluated for the PDMS–DVB and CAR–PDMS fibers working in the HS-SPME mode after the extraction of water samples spiked with 500 pg/ml. After desorption, the fiber was reinserted in the GC injector and a blank analysis was run. This

Table 5  
Temperature–extraction mode interaction (results are expressed as area counts)

Compound	Extraction mode	Temperature (°C)		
		25	60	100
Cashmeran	HS	24540	123389	127238
	Direct	56752	80936	37686
Celestolide	HS	24982	260568	352819
	Direct	60809	88738	103950
Phantolide	HS	14049	159388	247757
	Direct	50682	77098	83181
Traseolide	HS	11457	146463	258490
	Direct	33143	44521	71861
Galaxolide	HS	15989	209385	337896
	Direct	58319	82949	107127
Tonalide	HS	13322	186025	364795
	Direct	58015	83248	113946
Ambrettolide	HS	25696	217179	328375
	Direct	39674	51007	95673

Table 6  
Effect of sample volume on the efficiency of the SPME (expressed as area counts)

Compound	Sample volume (ml)			
	10	30	60	100
Cashmeran	7061	71234	96631	141324
Celestolide	33628	381298	557916	838700
Phantolide	34384	311506	404534	543526
Traseolide	42557	377437	544807	786854
Galaxolide	63229	482575	632160	835668
Tonalide	67527	490390	619408	805002
Ambrettolide	89498	600448	836276	1177926



process was carried out with each fiber. The response recorded for the seven target musks, was compared to the response obtained for the previously analysed water samples. In all cases, carryover for the CAR–PDMS fiber was higher than for the other fiber. For PDMS–DVB, carryover increased as did the retention time of the compounds. Nevertheless, it was lower than one thousandth (1‰), even for the macrocyclic musk, ambrettolide. When CAR–PDMS was used, the carryover found was about 3–5‰, with the exception of ambrettolide (25‰). This could be expected due to its more highly lipophilic nature.

### 3.3. Performance evaluation of the proposed method

Linearity, repeatability and detection limits were evaluated in order to assess the performance of the HSSPME method. Results are shown in Table 7.

The calibration studies were performed with PDMS–DVB and CAR–PDMS fibers, using 100 ml spiked water samples. These samples were analysed in duplicate or triplicate at the optimal extraction conditions established by the design and the complementary experiments discussed above. Calibration curves were linear in the concentration range studied: from 2 to 2000 pg/ml. As can be seen in Table 7, the  $r^2$  values were higher than 0.990 for all of the compounds so, a directly proportional relationship between the extracted amount of musks and its initial concentration in the sample at the tested concentration range was demonstrated. No differences were found in linearity when considering PDMS–DVB or

CAR–PDMS fibers. Linearity of cashmeran could not be evaluated at the total concentration range considered when using CAR–PDMS fiber, due to interference by a major unknown coeluting substance (most probably a polysubstituted phenolic compound).

The precision of the experimental procedure was also evaluated at two different concentration levels by calculating the relative standard deviation (RSD) of three replicates of each level (Table 7). The RSD values were between 7.7% and 21.0% with PDMS–DVB, and between 2.2% and 17.4% with CAR–PDMS. Highest values were obtained for the less volatile and more lipophilic musk, the ambrettolide.

Detection limits (based on a signal-to-noise ratio = 3) are shown in Table 7. These were below 1 pg/ml for celestolide, phantolide and traseolide with both fibers; 1–2 pg/ml for cashmeran, galaxolide and tonalide; and somewhat higher for ambrettolide. Nevertheless, these limits of detection must always be checked by analysing blank samples daily in order to update signal-to-noise ratios.

A real contaminated water sample taken from the effluent of an urban treatment plant was also analysed to check the method performance. Fig. 2 shows the total ion chromatogram. Concentration of the identified compounds was evaluated by external calibration and by standard addition. Both the PDMS–DVB and the CAR–PDMS fibers were used again. Results are presented in Table 8. These were very consistent using both fibers and both quantification methods. It must be pointed out that concentrations lie in the low ppt for the most of the musks, and only galaxolide and tonalide appear at higher

Table 7

Linearity, limit of detection and repeatability for the target musk compounds considering the PDMS–DVB and the CAR–PDMS fibers

Compound	Correlation factor ( $r^2$ )		Detection limit ( $S/N = 3$ pg/ml)		Repeatability (RSD, % $n = 3$ )			
	PDM–DVB	CAR–PDMS	PDM–DVB	CAR–PDMS	PDM–DVB		CAR–PDMS	
					10 pg/ml	2000 pg/ml	10 pg/ml	2000 pg/ml
Cashmeran	0.9989		1.7	1.5	9.1	13.2	3.9	7.9
Celestolide	0.9990	0.9985	0.1	0.1	8.4	7.9	3.7	6.5
Phantolide	0.9990	0.9991	0.2	0.3	9.1	11.1	2.4	0.96
Traseolide	0.9977	0.9991	0.3	0.3	8.9	13.5	6.9	14.1
Galaxolide	0.9986	0.9989	1.2	1.0	7.7	10.9	2.2	17.4
Tonalide	0.9999	0.9999	1.8	1.0	9.9	15.1	7.2	9.1
Ambrettolide	0.9968	0.9973	4.6	9.0	18.8	21.0	17.9	15.1

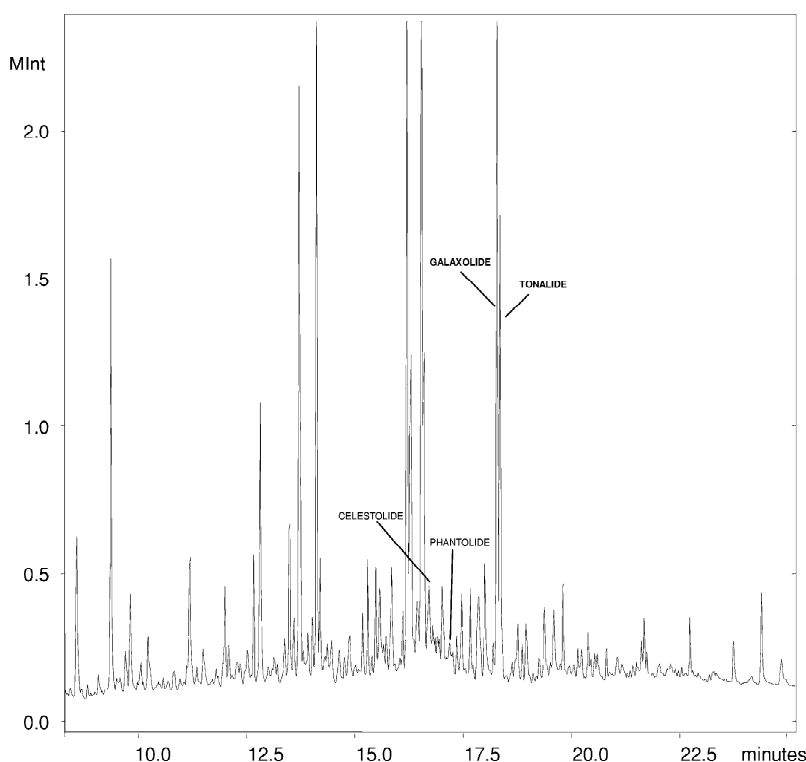


Fig. 2. Total ion chromatogram of a real water sample taken at the effluent of an urban treatment plant.

Table 8

Concentration (pg/ml) of the target musk compounds found in a real contaminated sample from an urban treatment plant

Compound	Standard addition		External standard	
	PDMS–DVB	CAR–PDMS	PDMS–DVB	CAR–PDMS
Cashmeran	nd	nd	nd	nd
Celestolide	12.3±0.8	9.8±1.1	9.1±0.6	10.7±1.2
Phantolide	6.8±0.7	4.9±0.7	5.3±0.6	4.5±0.6
Traseolide	15.8±0.3	12.3±1.2	12.9±0.3	12.8±1.3
Galaxolide	478±33	507±5	372±26	514±5
Tonalide	125±1	153±3	102±1	136±3
Ambrettolide	nd	nd	nd	nd

Results were obtained for the fibers PDMS–DVB and CAR–PDMS by two calibration methods: standard addition and external standard.

levels (about 500 and 120 ppt, respectively). As can be seen, a slight matrix effect was found for PDMS–DVB and so, the results obtained by this fiber using the external standard procedure were lower.

(Consellería de Medio Ambiente), project PGIDT99MA23701, and from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, project REN2000-0984 HID is gratefully acknowledged.

## Acknowledgements

Financial support from the Xunta de Galicia

## References

- [1] H.H. Wisneski, J. AOAC Int. 84 (2001) 376.

- [2] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environ. Health Persp.* 107 (1999) 907.
- [3] G.G. Rimkus, M. Wolf, *Chemosphere* 30 (1995) 641.
- [4] C. Struppe, B. Schäfer, W. Engewald, *Chromatographia* 45 (1997) 138.
- [5] R. Draisci, C. Marchiafava, E. Ferretti, L. Palleschi, G. Catellani, A. Anastasio, *J. Chromatogr. A* 814 (1998) 187.
- [6] J. Hajslova, P. Gregor, V. Chladkova, K. Alterova, *Organohal. Comp.* 39 (1998) 253.
- [7] K. Bester, H. Hühnerfuss, W. Lange, G.G. Rimkus, N. Theobald, *Water Res.* 32 (1998) 1857.
- [8] R. Kallenborn, R. Gatermann, S. Planting, G.G. Rimkus, M. Lund, M. Schlabach, I.C. Burkow, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 295.
- [9] T. Heberer, S. Gramer, H.J. Stan, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 27 (1999) 150.
- [10] S. Schwartz, V. Berding, M. Matthies, *Chemosphere* 41 (2000) 671.
- [11] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993) 2844.
- [12] M. Llompарт, B. Blanco, R. Cela, *J. Microcol. Sep.* 12 (2000) 25.
- [13] P. Landin, M. Llompарт, M. Lourido, R. Cela, *J. Microcol. Sep.* 13 (2001) 275.
- [14] M. Winkler, J.V. Headley, K.M. Peru, *J. Chromatogr. A* 903 (2000) 203.
- [15] Statgraphics-Plus, *Experimental Design, Appendix C, Manuistics*, Rockville, MD, 1996.
- [16] J. Pawliszyn, *Solid-Phase Microextraction, Theory and Practice*, Wiley, New York, 1997.



# Multivariate optimization of a solid-phase microextraction method for the analysis of phthalate esters in environmental waters

Maria Polo, Maria Llompart\*, Carmen Garcia-Jares, Rafael Cela

*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain*

Available online 5 January 2005

## Abstract

A solid-phase microextraction method (SPME) coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) has been developed for the determination of the six phthalate esters included in the US Environmental Protection Agency (EPA) Priority Pollutants list in water samples. These compounds are dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), di-*n*-butyl phthalate (DBP), butylbenzyl phthalate (BBP), di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-*n*-octyl phthalate (DOP). Detailed discussion of the different parameters, which could affect the extraction process, is presented. Main factors have been studied and optimized by means of a multifactor categorical design. Different commercial fibers, polydimethylsiloxane (PDMS), polydimethylsiloxane–divinylbenzene (PDMS–DVB), polyacrylate (PA), Carboxen–polydimethylsiloxane (CAR–PDMS) and Carbowax–divinylbenzene (CW–DVB), have been investigated, as well as the extraction mode, exposing the fiber directly into the sample (DSPME) or into the headspace over the sample (HS–SPME), and different extraction temperatures. The use of this experimental design allowed for the evaluation of interactions between factors. Extraction kinetics has also been studied. The optimized microextraction method showed linear response and good precision for all target analytes. Detection limits were estimated considering the contamination problems associated to phthalate analysis. They were in the low pg mL<sup>−1</sup>, excluding DEHP (100 pg mL<sup>−1</sup>). The applicability of the developed SPME method was demonstrated for several real water samples including mineral, river, industrial port and sewage water samples. All the target analytes were found in real samples. Levels of DEP and DEHP were over 1 ng mL<sup>−1</sup> in some of the samples.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Multifactor optimization; Factorial design; Solid-phase microextraction; Extraction methods; Phthalate esters; Water analysis

## 1. Introduction

Phthalic acid esters (dialkyl or alkylaryl esters of 1,2-benzenedicarboxylic acid), also known as phthalates, are a class of chemicals that are produced at large scale due to the wide variety of uses. World production of these compounds is estimated to be several million tonnes per year. Significant migration of them into the environmental compartments is possible during their production, manufacture, use and disposal [1,2]. Certain phthalates and/or their metabolites are suspected human cancer-causing agents, and endocrine disruptors [3]. Due to their potential risks for human health and environment, several of them have been included in the pri-

ority list of pollutants of different national and supranational organizations. In this way, up to 12 PAEs, including di-*n*-butyl phthalate (DBP), butylbenzyl phthalate (BBP), and di-2-ethylhexyl phthalate ester (DEHP), are in the list of the proposed substances suspected to produce endocrine alterations published by European Union (EU) [4]. According to Section 307 of the US Clean Water Act, diethyl phthalate (DEP), dimethyl phthalate (DMP), DEHP, BBP, DBP and di-*n*-octyl phthalate (DOP) should be considered Priority Toxic Pollutants [5]. DEHP is the most prevalent phthalate used and, thus, the most regulated. The EU has included it in the list of 33 substances of priority or possibly priority substances in the field of water policy [6]. The World Health Organization (WHO) has established a guideline value of 8 ng mL<sup>−1</sup> for DEHP for fresh and drinking water [7], which is similar to the maximum contaminant level (MCL) for DEHP set by the Environmental Protection Agency (EPA) (6 ng mL<sup>−1</sup>). This

\* Corresponding author. Tel.: +34 981563100x14387;  
fax: +34 981595012.

E-mail address: [qblvrlgb@usc.es](mailto:qblvrlgb@usc.es) (M. Llompart).

agency recommends the closely monitoring of concentrations above  $0.6 \text{ ng mL}^{-1}$  [8]. Other institutions as the Netherlands National Institute of Public Health and Environment [3] and the Danish Environmental Protection Agency [9] have also established some limits.

Taking into account all these considerations, the development of sensitive and reliable analytical methods to analyze phthalates from different water samples is necessary. Considerable care must be taken to avoid sample contamination, which is the main problem associated to phthalate analysis [10].

Extraction and pre-concentration techniques, such as liquid–liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) are widely applied to determine phthalates in water samples [10–13]. The EPA has published analytical procedures dealing with the determination of phthalate esters in drinking water and in municipal and industrial wastewater [14,15] based on these pre-concentration techniques. Nevertheless, these methods are expensive, time-consuming, and employ different sorbent materials and solvents, enhancing contamination risks. In the last years, solid-phase microextraction (SPME) has acquired an increased importance in the analysis of semivolatile compounds [16–18] including phthalates [19–23]. This technique is an interesting alternative for the determination of phthalates in aqueous samples, because the risk of contamination during sample handling can be significantly reduced. In addition, the elimination of organic solvents in the sample preparation process could reduce phthalate background levels. Nevertheless, the main problem for applying SPME to phthalate analysis is the levels of phthalates found in blanks of laboratory purified water and even commercial water (especially for DBP and DEHP).

In these studies, some factors affecting the extraction efficiency are evaluated. Nevertheless, most papers consider optimization strategies based in the study of one factor at a time. This approach can lead to erroneous conclusions about the importance of certain factors on the extraction process, due to the fact that interactions between factors are not being considered. A multivariate approach to the optimization of the SPME process allows the simultaneous study of various factors and then, it is more advantageous than univariate. To the knowledge of the authors, up to now only one study using a multivariate strategy was applied to the problem of phthalate determination by SPME [23]. In this interesting study, a screening method for the analysis of 16 PAHs, 6 PCBs and 6 phthalate esters has been developed using multisimplex optimization. Due to blank problems, detection limits for some phthalates were quite high, especially for DEHP ( $3.15 \mu\text{g L}^{-1}$ ). In addition, due to inherent difficulties of simplex with categorical variables only one fiber (PDMS) was studied, although many others are potentially applicable to phthalate analysis.

In the present work, a SPME method followed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis was developed for the determination of phthalate esters in water samples following a multivariate optimization strategy.

A multifactor categorical design was selected to study and optimize main experimental factors affecting SPME. This kind of experimental design allows the study of main effects as well as second order interactions. The factors included in this design were type of fiber, extraction mode and extraction temperature, and from the result obtained, it could be demonstrated that these three factors are essential to achieve high sensitivity. It could be also demonstrated that some interaction effects between factors must be considered.

Bearing in mind that the main problem for applying SPME to phthalate analysis are the levels of phthalates found in blanks of purified water, detailed discussion about methodological aspects of the analysis (such as the precautions to minimize contamination) is provided. Finally, the optimized method is evaluated in terms of linearity and precision. Limits of detection (LODs) are found at the  $\text{pg mL}^{-1}$  level and the applicability of the proposed method to real water samples is demonstrated.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

Dimethyl phthalate (>98%) and diethyl phthalate (>98%) were purchased from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland); di-*n*-butyl phthalate (>98%) and di-2-ethylhexyl phthalate (>99%) were from Sigma (St. Louis, MO, USA); and benzyl butyl phthalate (97.2%) and di-*n*-octyl phthalate (99.7%) were supplied by Riedel-de H  en (Seelze-Hannover, Germany) and Supelco (Bellefonte, PA, USA), respectively.

Isooctane, acetone, and NaCl were all purchased from Merck (Mollet del Valles, Barcelona, Spain). All the solvents and reagents were analytical grade. Ultrapure (resi-analyzed) water for environmental inorganic and organic trace analysis was supplied by J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Individual stock solutions of each phthalate ester ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were prepared in acetone. A standard mixture of the target analytes was prepared at a final concentration of about  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  in acetone. From this solution, several standard working solutions were prepared. Solutions were stored at  $-20^\circ\text{C}$  and working solutions were prepared weekly.

Different real water samples were analyzed: bottled mineral water, river water, industrial harbour water, influent and effluent from a sewage treatment plant (corresponding to a population of approximately 100,000 inhabitants located in Galicia, Spain), and wastewater from an urban collector.

Commercially available  $100 \mu\text{m}$  polydimethylsiloxane (PDMS),  $65 \mu\text{m}$  polydimethylsiloxane–divinylbenzene (PDMS–DVB),  $85 \mu\text{m}$  polyacrylate (PA),  $74 \mu\text{m}$  Carboxen–polydimethylsiloxane (CAR–PDMS) and  $65 \mu\text{m}$  Carbowax–divinylbenzene (CW–DVB) fibers housed in manual SPME holders were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Special care was taken to avoid the contact of reagents and solutions with plastic materials. Laboratory glassware was washed prior to use with ultrapure water and dried at 250 °C. This material was stored in aluminium foil to avoid adsorption of phthalates from the air.

## 2.2. Experimental set-up

Aliquots of 10 mL sample were placed in headspace vials of 22 mL, which were cleaned according to the procedure described earlier. Stir bars (also previously cleaned) were introduced into the samples, and then, vials were sealed with a headspace aluminium cap furnished with a PTFE-faced septum, and immersed in a water bath maintained at the temperature of the experiment. Samples were let to equilibrate for 5 min before analysis. SPME fibers were re-conditioned at 260–290 °C (depending on the fiber used) for at least 3 min and then, exposed to the headspace over the sample or immersed into the sample for 5–80 min, depending on the experiment. During all the sampling process, samples were magnetically stirred. Once finished the exposition period, the fiber was immediately inserted into the GC injector and chromatographic analysis was carried out. Considering the thermal stability of phthalates, we selected the maximum possible desorption temperatures for each fiber (without exceeding 290 °C) in order to achieve maximum response; thus, desorption temperature was 260 °C for CW–DVB, 270 °C for PDMS and PDMS–DVB, and 290 °C for PA and CAR–PDMS fibers. Desorption time was set at 5 min.

The wastewater samples analyzed were previously filtered through glass fiber filters (Millipore, Madrid, Spain). All the filtration process was performed using glass material which was cleaned following the procedure indicated in Section 2.1.

## 2.3. Gas chromatography–mass spectrometry

The GC–MS analyses were performed on a Varian 3800 gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) equipped with an ion-trap mass detector Varian Saturn 2000 (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA). The system was operated by Saturn GC–MS Workstation v5.4 software. Phthalate esters were separated on a 25 m length  $\times$  0.25 mm i.d., CP-Sil8 CB Low-bleed/MS column (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) coated with a 0.25  $\mu$ m film. The GC oven temperature program was: 60 °C hold 2 min, rate 20 °C min<sup>−1</sup> to 190 °C, rate 10 °C min<sup>−1</sup> to 280 °C, hold for 5 min. Helium (purity 99.999%) was employed as carrier gas, with a constant column flow of 1.2 mL min<sup>−1</sup>. Injector was operated in the splitless mode and programmed to return to the split mode after 2 min from the beginning of a run. Split flow was set at 50 mL min<sup>−1</sup>. Injector temperature was between 260 and 290 °C depending on the fiber used. The ion-trap mass spectrometer was operated in the electron ionisation mode (70 eV). The mass range was scanned from 80 to 300 amu.

Table 1

Retention time and selected ions for the analysis of the target phthalates

Compound	Retention time (min)	Quantification ions	Identifications ions
DMP	8.31	163, 164	163, 164
DEP	9.21	149, 177	149, 176, 177, 222, 223
DBP	11.93	149	149, 205
BBP	15.06	149, 206	91, 104, 149, 206
DEHP	16.15	149, 167	149, 167
DOP	17.90	149, 279	149, 279

Experimental parameters for ionisation were: multiplier voltage, 1750 V; filament emission current, 30  $\mu$ A; axial modulation voltage, 4 V; ionisation control, automatic mode; filament/multiplier delay, 6 min. Trap, manifold and transfer line temperatures were 250, 50 and 280 °C, respectively.

## 3. Results and discussion

First experiments were conducted to optimize the chromatographic separation of the target analytes and the optimal conditions are described in Section 2. In these conditions, all analyzed phthalate esters were adequately resolved avoiding interferences with siloxane peaks coming from the chromatographic column and/or the coating of SPME fibers. In Table 1, the retention times at the optimized chromatographic conditions, as well as, the identification and quantification ions (based on best signal-to-noise criteria) are shown.

It is well known that the most important problem concerning phthalate analysis is the risk of contamination, resulting in false positive results and over-estimated concentrations. The sources of contamination can be present in any step of the analytical procedure. To check the presence of phthalates in the chromatographic system (in the inlet and the gas supply system), blank runs of the chromatograph and direct injections of isooctane were made. The presence of phthalate esters was not detected. None of the target phthalates was present in the chromatograms.

Before starting SPME optimization, blank chromatographic injections of the SPME device using different coatings were made. In these analyses, the presence of phthalates was detected. To avoid this background problem, the SPME fibers were desorbed at 270 °C just before injection. In this way, consistent blanks were attained. So this pre-processing step was applied systematically in all experiments described.

### 3.1. Optimization of microextraction process: multifactor categorical design

A factorial design was carried out to evaluate the influence of main factors affecting the microextraction process in order to obtain the optimal values. The experimental parameters studied were: type of fiber, extraction mode and extraction temperature. The fibers included in the design were: 100  $\mu$ m PDMS, 65  $\mu$ m PDMS–DVB fiber, 75  $\mu$ m CAR–PDMS,

Table 2  
ANOVA results showing the significance of main effects and interactions

Compound	Source	Main effects			Interactions		
		Fiber (A)	Temperature (B)	Extraction mode (C)	AB	AC	BC
DMP	<i>F</i> -value	10.31	0.65	26.48	1.62	5.57	0.84
	<i>p</i> -ratio	0.00	0.55	0.00	0.25	0.02	0.47
DEP	<i>F</i> -value	14.99	5.49	44.38	1.76	8.10	1.08
	<i>p</i> -ratio	0.00	0.03	0.00	0.22	0.01	0.38
DBP	<i>F</i> -value	20.09	44.33	90.63	3.16	6.41	8.59
	<i>p</i> -ratio	0.00	0.00	0.00	0.06	0.01	0.01
BBP	<i>F</i> -value	8.15	2.29	77.44	1.14	4.47	0.92
	<i>p</i> -ratio	0.01	0.16	0.00	0.43	0.01	0.44
DEHP	<i>F</i> -value	3.33	35.13	5.83	1.35	0.55	20.96
	<i>p</i> -ratio	0.07	0.00	0.04	0.34	0.71	0.00
DOP	<i>F</i> -value	6.66	40.57	0.11	3.17	0.54	10.93
	<i>p</i> -ratio	0.01	0.00	0.74	0.06	0.71	0.01

Italicized numbers are used to denote a significant effect.

65  $\mu\text{m}$  CW–DVB and 85  $\mu\text{m}$  PA. In principle, all these fibers could be adequate for phthalate extraction. Extraction temperature was set at three levels: 25, 60 and 100 °C and the extraction mode was direct sampling (DSPME) and headspace sampling (HS–SPME), depending on the experiment.

A multifactor categorical  $5 \times 3 \times 2$  type V resolution design, which involves 30 runs, was selected [24]. This design is a standard factorial, consisting of all combinations of the levels of the factors, that enables the study of main effects, as well as two-factor interactions. The design was carried out with 10 mL aliquots of ultrapure water spiked at 4 ng mL<sup>−1</sup> of each target analyte. Sampling time was set at 20 min to achieve maximum throughput considering GC run time.

One of the statistical options of the proposed design is the analysis of variance (ANOVA) which measures whether a factor contributes significantly to the variance of the response. The results of the ANOVA are shown in Table 2. In this table, and for the sake of simplicity, only the *F*-ratios and *p*-values are given. The *F*-ratios measure the contribution of each factor or interaction on the variance of the response. The *p*-values test the statistical significance of each of the factors and interactions. When *p*-value is less than 0.05, the factor has a statistically significant effect at the 95% confidence level. As can be seen, all three main factors were found to be significant for most compounds. Furthermore, interaction between type of fiber and extraction mode (AC), and interaction between temperature and extraction mode (BC) were significant for some compounds. Considering *F*-ratio values, it is evident that temperature plays a very important role in the extraction of DBP, DEHP and DOP, and extraction mode in the extraction of DMP, DEP, DBP and BBP. An adequate selection of the optimal conditions requires a deeper look at the results of the design by means of the graphic options.

Fig. 1 shows the response plots for type of fiber and extraction temperature. As can be seen, the most efficient

extraction conditions for DMP and DEP were obtained using CAR–PDMS at 100 °C. Nevertheless, for the remaining compounds, other fibers perform better. That is, their response increases while the response for CAR–PDMS decreases. The highest microextraction response is reached using PDMS–DVB fiber at 100 °C (for DEHP, responses with PDMS–DVB and PA were almost identical). CAR–PDMS, however, presented very low efficiency for the extraction of BBP, DEHP and DOP. For this last compound, the CAR–PDMS response was almost negligible. On the other hand, PDMS–DVB yielded the highest microextraction efficiency for DBP, BBP, DEHP and DOP, and was the second most efficient fiber for the extraction of DMP and DEP. Both fibers (CAR–PDMS and PDMS–DVB) have an intermediate polarity but they differ in the pore size. Carboxen coating has a micropore size ideal to extract small molecules and PDMS–DVB mainly presents mesopore size best suited to extract medium molecular sized compounds. The relation between molecular size and extraction efficiency using CAR–PDMS fiber was clearly appreciated in our study, where CAR–PDMS was only suitable for the extraction of the two compounds with the smallest molecular size (DMP and DEP). Regarding the type of fiber other aspect can be pointed out. For DOP and especially for DEHP, the responses with all fibers excluding CAR–PDMS were quite similar and, initially, all these fibers would be suitable for the extraction of these two compounds. As it has been already mentioned, the most favourable extraction temperature for all compounds was 100 °C but the influence of this factor is more pronounced for the two least volatile compounds, DEHP and DOP. For these compounds, responses at 25 and 60 °C are considerably lower (see Fig. 1).

Fig. 2 shows the response plots for the factors temperature and extraction mode. No significant interaction was found for DBP, DMP, DEP and BBP, and the most suitable extraction mode at any temperature is direct sampling



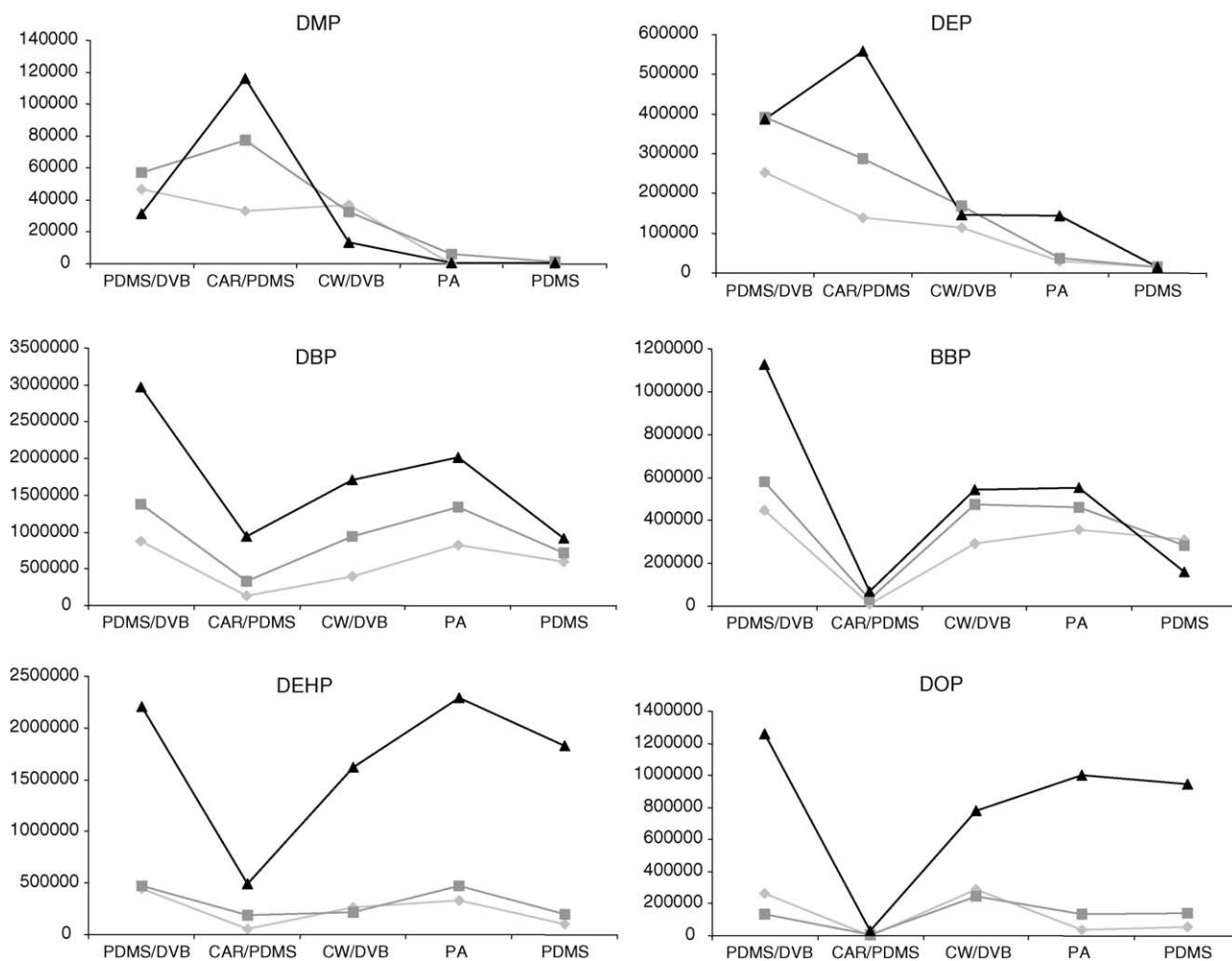


Fig. 1. Fiber-extraction temperature interaction plots for all target phthalates (response in area counts): (◆) 25 °C, (■) 60 °C and (▲) 100 °C.

(DSPME), although, the highest microextraction response was generally obtained by direct sampling at 100 °C. However, for DEHP and DOP, a significant interaction between these two factors was, in fact, observed. At 25 and 60 °C, HS-SPME response was very low and, therefore, DSPME is recommended at this temperature interval. However, at 100 °C, the response obtained by HS-SPME increases markedly, and maximum response is achieved under these conditions. Initially, it might appear strange that the apparently less volatile analytes are more efficiently extracted by HS-SPME and the least volatile ones by DSPME. It is true that the lower molecular weight phthalate esters are quite volatile, but because of their moderate water solubility they have a very low Henry law constant ( $H$ ) [25]. In consequence, they volatilise very slowly from aqueous solutions. On the other hand, the higher molecular weight phthalate esters are less volatile, but because of their very low water solubility they have a considerably higher Henry law constant ( $H$ ). Thus, the higher molecular weight phthalate esters will potentially evaporate more rapidly from water, especially at high temperature and this phenomena might be the cause of the behavior observed.

Finally, Fig. 3 shows the response plot for the factors type of fiber and extraction mode. Only the diagram corresponding to DOP has been included since the graphs for the remaining compounds do not add more information to the results already commented. In this figure, HS-SPME appears as the most convenient sampling mode for all the fibers but PDMS–DVB and, although responses for all fibers and for both sampling modes are quite similar (excluding CAR–PDMS responses) maximum response was achieved by PDMS–DVB and direct sampling.

As concluded from these observations, the optimal extraction conditions are presented in Table 3. These conditions were different depending on the considered compounds, so the final selection should consider the purpose of the study. If the objective is mainly to analyze DEHP, best conditions would include HS-SPME sampling mode. On the other hand, to analyze the most volatile phthalate esters, such as DMP and DEP, CAR–PDMS would be the most suitable fiber. If simultaneous analysis of all compounds is required; the most favourable conditions are DSPME at 100 °C using PDMS–DVB fiber. In fact, these conditions were employed for the rest of experiments in this study.

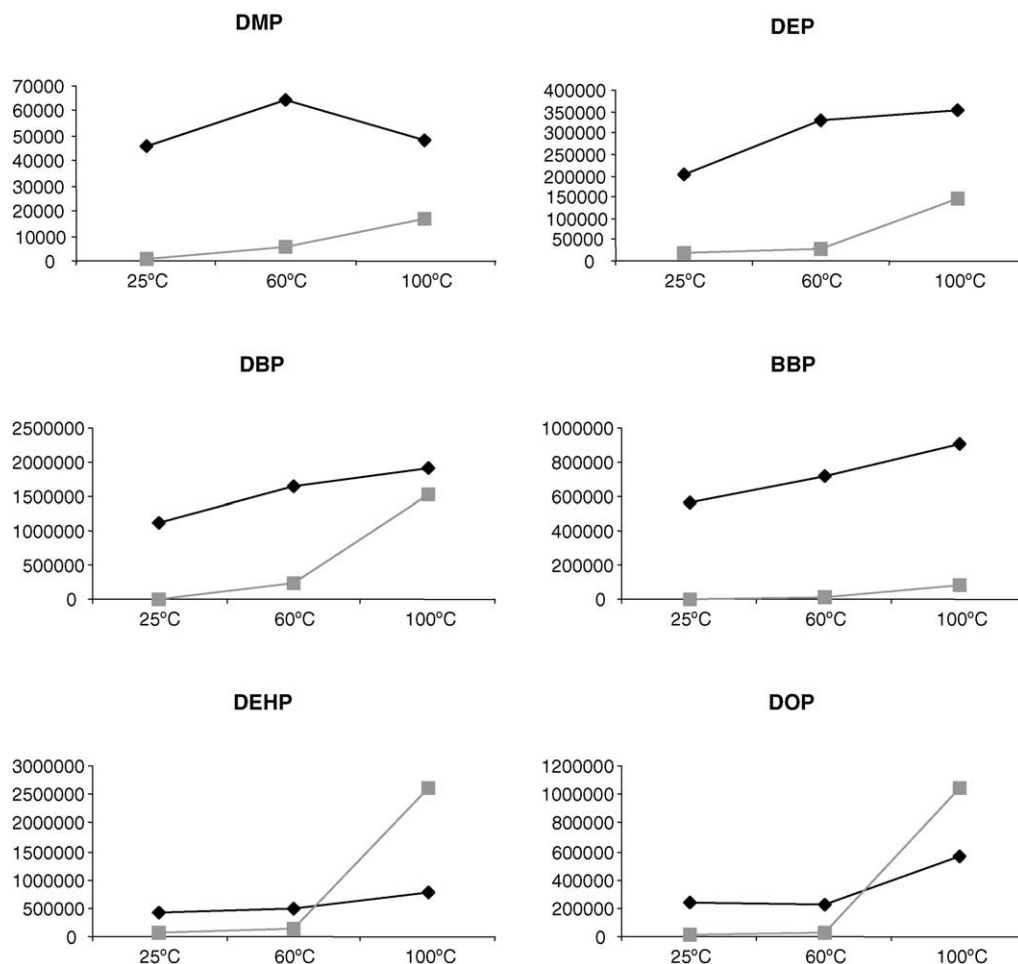


Fig. 2. Extraction temperature–extraction mode interaction plots for all compounds (response in area counts): (▲) DSPME and (◆) HS-SPME.

The addition of salt was initially not considered to avoid additional sources of possible phthalate contamination that could distort the results of the design. In fact, in our first experiments to study the influence of this factor, we had serious contamination problems with NaCl bottled in a plastic container. So, we decided to purchase high purity reagent

in a glass bottle. This reagent was suitable for phthalate analysis and did not require previous clean-up, since solvent extraction of this salt did not show the presence of phthalates in the GC–MS analysis. Under these conditions, the salting effect was evaluated by analysing water samples with 0 and 20% NaCl, in the experimental conditions indi-

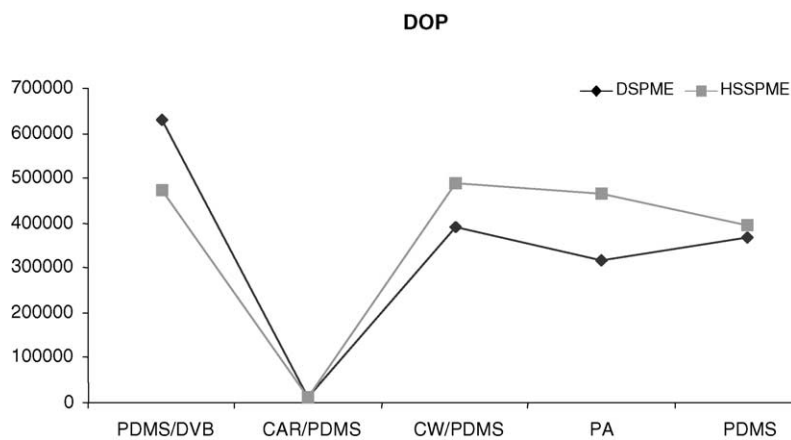


Fig. 3. Fiber–extraction mode interaction plot for DOP (response in area counts).

Table 3

Optimal conditions for each compound given by multifactor categorical  $5 \times 3 \times 2$  design

	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DOP
Fiber	CAR-PDMS	CAR-PDMS	PDMS-DVB	PDMS-DVB	PA	PDMS-DVB
Temperature (°C)	100	100	100	100	100	100
Sampling mode	SPME	SPME	SPME	SPME	HS-SPME	SPME

cated earlier (DSPME, PDMS–DVB, 100 °C). Addition of salt produced a noticeable increase in the response obtained for DMP and DEP, while for the rest of compounds the response decreased, especially for DOP. As is known, the addition of salt increases the ionic strength of the water sample and in this way, it can favour the transfer of neutral analytes from the sample to the fiber. This effect is evident for DMP and DEP, the two analytes with the highest water solubility and the lowest molecular size. For the rest of compounds, analytes with very low water solubility and quite slow SPME kinetics (see Section 3.2), kinetic aspects could be responsible of the observed decrease in response. Similar behavior has been observed for other organic pollutants [26,27].

The influence of extraction time was also studied and the results are shown in Fig. 4. As can be seen, the time required for reaching equilibrium is, in general, directly related to the molecular weight of the phthalate. For DMP and DEP, the extraction kinetics is quite fast and equilibrium is achieved in 20 and 40 min, respectively. After 80 min of sampling, a decrease in DMP response is observed; this behavior might be due to competitive adsorption that could produce the displacement of more volatile analytes from the fiber surface [28]. For the rest of compounds, equilibrium is not reached even within 80 min of exposure.

### 3.2. Performance evaluation of the proposed method

For the following studies, the optimal SPME experimental design conditions (DSPME, PDMS–DVB coating, 100 °C extraction temperature) were employed. Extraction time was 20 min.

To evaluate the performance of the method in terms of linear range and detection limits, it is necessary, or at least convenient, to have water free of analytes to establish the background of the method. Nevertheless, one of the most important problems in the analysis of phthalates in water samples is the detection of these compounds in the samples used as blanks. Phthalates have been detected in purified water commonly used in laboratories, including water distilled in a glass distillation apparatus, Milli-Q water, and commercially available water special for VOC determination. Some authors have reported the levels of phthalate esters found in purified water employed in their studies [23,29,30]. The concentrations found are frequently high considering the levels of concentration at which these compounds must be controlled in the environment [3,7–9]. These blank signals

forced the limits of detection achieved, mainly for DBP and DEHP, the most ubiquitous phthalate esters. In the present study, blank SPME analyses were initially carried out with Milli-Q water, and the presence of phthalates was detected being BBP and DEHP the compounds found at the highest level. Analyses of commercial ultrapure water (see Section 2) shown the presence of DEP and DBP at very low levels and DEHP at higher level although lower than in our laboratory Milli-Q water. The estimated concentrations of DEP, DBP and DEHP were 5, 14 and 550  $\text{pg mL}^{-1}$ , respectively. Contamination of commercial ultrapure water by DEHP was further evidenced because other real mineral and river water samples analyzed in identical conditions produced 10-fold lower results for DEHP. However, regarding DEP and DBP, it is difficult to accurately assign the origin of the detected levels. These results may be attributed to the presence of low levels of these compounds in the commercial ultrapure water or due to contamination during the analytical procedural stages. In spite of these results, because the unavailability of a perfect blank water sample, the commercial ultrapure water was adopted for further performance studies.

To evaluate linearity of the SPME method, calibration studies were performed using multilevel spiked samples. The concentration range tested was from 80 to 8000  $\text{pg mL}^{-1}$  for DMP, DEP, DBP, BBP and DOP, and from 500 to 8000  $\text{pg mL}^{-1}$  for DEHP. Background levels were subtracted from the results. Coefficients of determination ( $R^2$ ) are given in Table 4. They were equal or higher than 0.998, demonstrating a directly proportional relationship between the extracted amount of phthalate esters and their initial concentration in the sample.

Precision of the experimental procedure was also evaluated at two different concentration levels by calculating the relative standard deviation (RSD) of three replicates of each level. These results are shown in Table 4. RSD values were between 3.4% for DEP and 16% for DEHP, and between 7.3% for BBP and 12% for DEP, for the low and the high concentration level, respectively.

Estimates of detection limits ( $\text{LOD} = \text{blank signal} + 3\text{SD}$ ) take into account the background levels measured in the commercial ultrapure water. Obviously, this approach cannot be applied to DEHP because the important contamination detected in the performance sample. Because we tested several different water samples including natural and drinking ones as well as ultrapure from different origins, the background level used to calculate LOD for DEHP was that found in the sample giving the lowest signal. In this way, the estimated

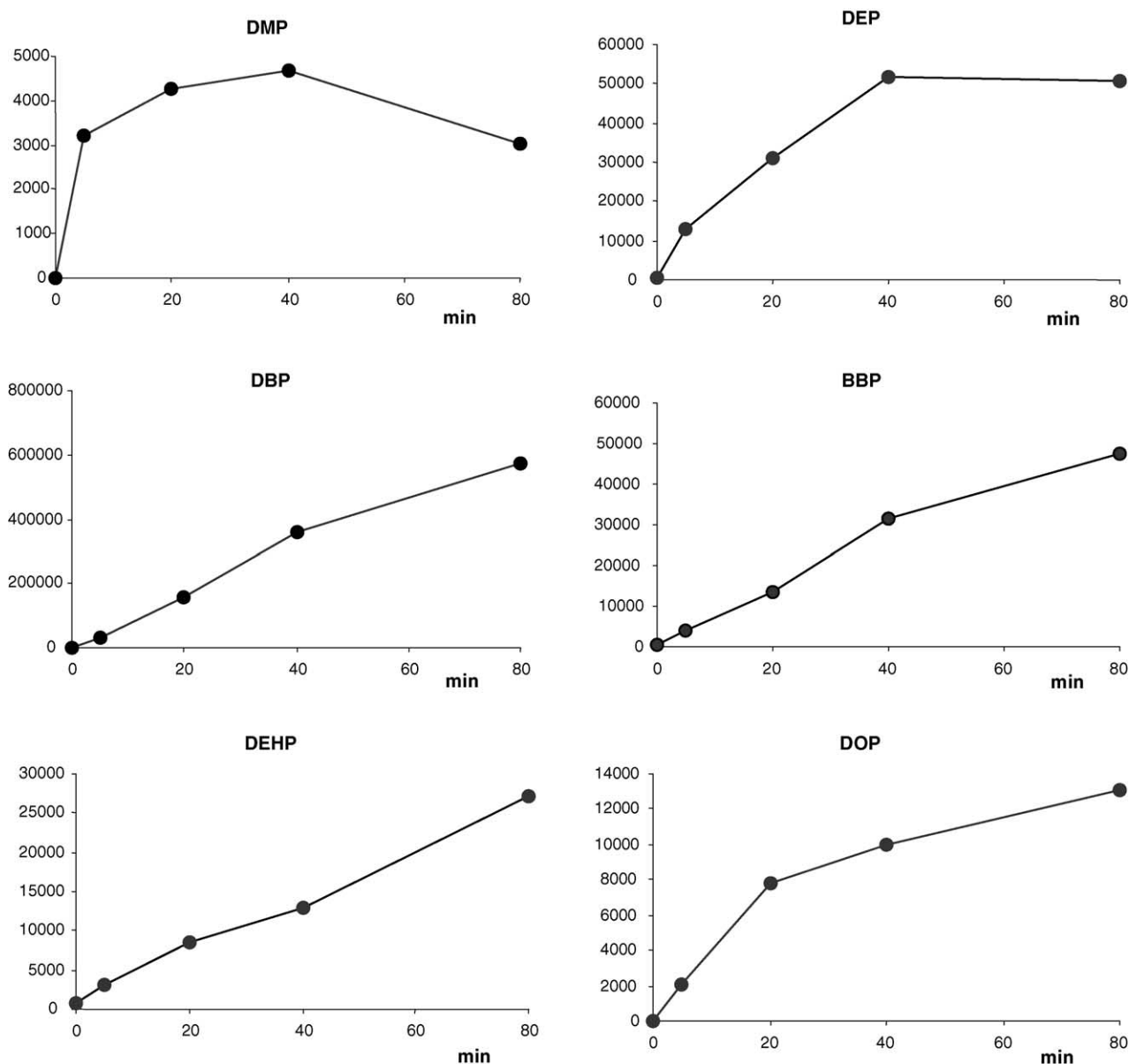


Fig. 4. Extraction times profiles (response in area counts). Extraction conditions: PDMS–DVB, 100 °C, DSPME.

LODs are summarised in Table 4. These estimates may be considered as conservative. If the levels of phthalates found in blank sample analyses might be attributed to real sample contamination instead of process contamination, the estimated LODs for DEP, DBP and DEHP would be considerably lower, probably below  $2 \text{ pg mL}^{-1}$ .

When filtration is carried out before SPME (e.g. wastewater samples), it must be considered in the estimation of LODs as a possible source of contamination. The current study evaluated this effect by analysing blanks of ultrapure water before and after filtration. The responses obtained were equivalent in both cases, with the exception of DEP and DBP. In consequence, estimated LODs for these compounds are higher when a filtration step is included (37 and  $60 \text{ pg mL}^{-1}$  for DEP and DBP, respectively).

Table 4

Linearity, limit of detection (LOD) and repeatability of the proposed method

Compound	Coefficient of determination ( $R^2$ )	LOD ( $\text{pg mL}^{-1}$ )	Repeatability (RSD, %)	
			500 $\text{pg mL}^{-1}$	2500 $\text{pg mL}^{-1}$
DMP	0.9989	8	5.2	8.2
DEP	0.9991	7	3.4	12
DBP	0.9990	26	9.7	9.3
BBP	0.9985	2	8.0	7.3
DEHP	0.9994	103	16	6.0
DOP	0.9980	16	11	11

### 3.3. Analysis of real samples

Due to their widespread applications, phthalates were found in all examined samples. Real samples analyzed in-

cluded: mineral bottled water, industrial harbour water, river water, urban collector water, and influent and effluent waters from an urban wastewater treatment plant. Influent sample is the most complex matrix of all them, so this sample was selected to study possible matrix effects. This sample was spiked with the target analytes and analyzed by the proposed procedure. The amounts of analytes found were in good agreement with the amount of analyte added obtaining recoveries from 87 to 110% (RSD = 3–10%). Therefore, no significant matrix effects were found, which makes possible quantification by external standard calibration. Table 5 shows the phthalate concentrations found in the different water samples. As indicated in Section 2, wastewater samples were filtered and filtration blanks were considered for quantification. DEP, DBP and DEHP were the compounds present in more extent, especially in the urban wastewater samples. These high concentrations could be expected since DEHP is the most used plasticizer and DEP and DBP are quite com-

Table 5

Concentration ( $\text{pg mL}^{-1}$ ) of the target phthalates found in real samples

Water samples	Concentration ( $\text{pg mL}^{-1}$ )					
	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DOP
Bottled mineral	26	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
Industrial harbour	<LOD	1606	<LOD	19	<LOD	<LOD
River	28	30	<LOQ	11	<LOD	<LOD
Effluent	<LOD	116	303	<LOD	859	<LOD
Influent	<LOD	2917	405	21	3280	<LOD
Urban collector	<LOD	460	866	127	6172	270

LOD: detection limit; LOQ: quantification limit.

mon components in personal care and pharmaceutical products (PPCPs). In Fig. 5, the chromatogram obtained for the influent wastewater plant sample is shown. In the industrial harbour water sample, DEP appeared at high level of concentration; surprisingly, DBP and DEHP were under LOD. DMP was detected in the mineral and river water samples at lev-

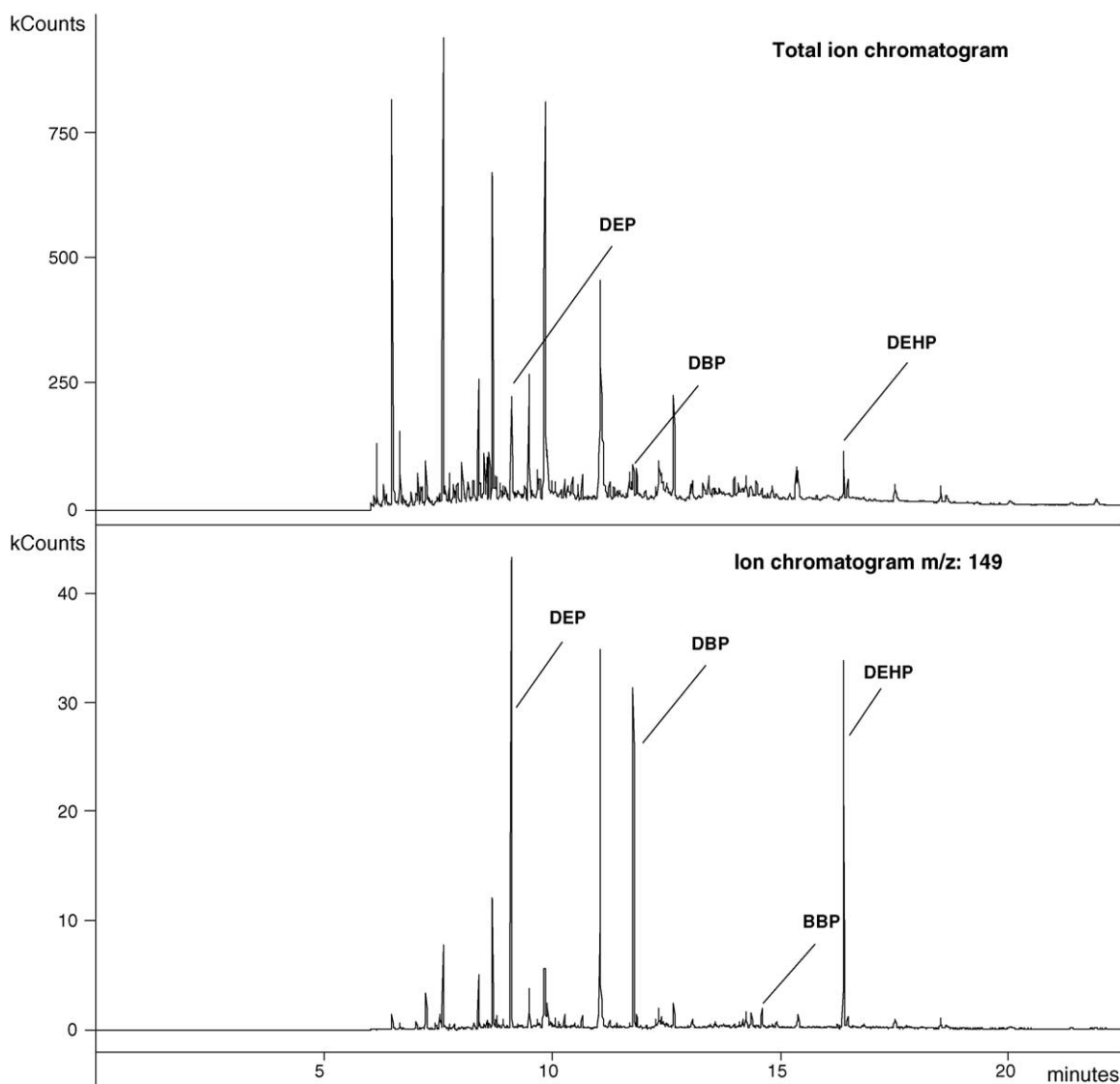


Fig. 5. Chromatograms of an influent wastewater plant sample. Extraction conditions: PDMS–DVB, 100 °C, DSPME, 20 min.

els of 25–30 pg mL<sup>-1</sup>. DOP was only detected in an influent wastewater sample.

## Acknowledgements

This research was supported by the projects BQU2003-02090 from CICYT Spanish Commission for Research and Development (Ministerio de Ciencia y Tecnología); and the project PGIDIT03PXIC23701PN from the Xunta de Galicia (Conselleria de Medioambiente). M. Polo would like to acknowledge her doctoral grant to the Xunta de Galicia.

## References

- [1] M.K. Stanley, K.A. Robillard, C.A. Staples, in: C.A. Staples (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry. Part Q. Phthalate Esters*, vol. 3, Springer, Berlin, 2003, p. 1.
- [2] C.A. Staples, D.R. Peterson, T.F. Parkerton, W.J. Adams, *Chemosphere* 35 (1997) 667.
- [3] A.P. Wezel, P. van Vlaardinger, R. Posthumus, G.H. Crommentuijn, D.T.H.M. Sijm, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46 (2000) 305.
- [4] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the community strategy for endocrine disrupters—a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, COM (1999) 706; COM (2001) 262 final, Brussels, 2001.
- [5] US Environmental Protection Agency, *Introduction to Water Policy Standards*, Office of Water, Washington, DC, 1999.
- [6] European Union Commission, Decision No. 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, Off. J. Eur. Commun. L 331 (2001) 1.
- [7] World Health Organization (WHO), Chapter 8: Chemical Aspects, *Guidelines for Drinking-Water Quality*, third ed. (Draft), World Health Organization, Geneva, 2003, [http://www.who.int/docstore/water\\_sanitation\\_health/GDWQ/Updating/draftguidel/2003gdwq8.pdf](http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/GDWQ/Updating/draftguidel/2003gdwq8.pdf).
- [8] US Environmental Protection Agency (EPA), National Primary Drinking Water Regulations Federal Register, Part 12, 40 CFR Part 141, US EPA, Washington, DC, 1 July 1991, p. 395.
- [9] Danish Environmental Protection Agency, *Guidelines on remediation of contaminated sites*, Environmental Guidelines No. 7, 2002, <http://www.mst.dk/udgiv/publications/2002/87-7972-280-6/pdf/87-7972-281-4.pdf>.
- [10] F. David, P. Sandra, B. Tienpont, F. Vanwalleghe, in: C.A. Staples (Ed.), *The Handbook Of Environmental Chemistry. Part Q. Phthalate Esters*, vol. 3, Springer, Berlin, 2003, p. 9.
- [11] V. López-Avila, J. Milanes, J. AOAC 74 (1991) 793.
- [12] S. Jonsson, H. Boren, J. Chromatogr. A 963 (2002) 393.
- [13] S. Jara, C. Lysebo, T. Greibrokk, E. Lundanes, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 165.
- [14] US Environmental Protection Agency (EPA), *Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater*, Method 606: phthalate ester, Code of Federal Regulations 40 CFR 141.136, Washington, DC, 2001, p. 89 (Appendix A).
- [15] US Environmental Protection Agency (EPA), Method 8061A: phthalate esters by gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD), Revision 1, On-Line Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods (SW-846), Office of Solid Waste, Washington, DC, 1996.
- [16] J. Pawliszyn, *Applications of Solid-Phase Microextraction*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- [17] B. Zygmunt, A. Jastrzebska, J. Namiesnik, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 1.
- [18] M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A 889 (2000) 3.
- [19] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 872 (2000) 191.
- [20] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 922 (2001) 377.
- [21] K. Luks-Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, J. Chromatogr. A 938 (2001) 93.
- [22] G. Prokupkova, K. Holadava, J. Poustka, J. Hajslova, *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 211.
- [23] E. Cortazar, O. Zuloaga, J. Sanz, J.C. Raposo, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J. Chromatogr. A 978 (2002) 167.
- [24] Statgraphics-Plus, *Experimental Design*, Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA (Appendix C).
- [25] I.T. Cousins, D. Mackay, T.F. Parkerton, in: C.A. Staples (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry. Part Q. Phthalate Esters*, vol. 3, Springer, Berlin, 2003, p. 57.
- [26] M. Polo, G. Gómez-Noya, J.B. Quintana, M. Llompарт, C. García-Jares, R. Cela, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1054.
- [27] P. Landin, M. Llompарт, M. Lourido, C. García-Jares, R. Cela, J. AOAC Int. 86 (2003) 44.
- [28] S.N. Semenov, J.A. Koziel, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 873 (2000) 39.
- [29] K. Hashizume, J. Nanya, C. Toda, T. Yasui, H. Nagano, N. Kojima, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 209.
- [30] S. Jonsson, J. Ejlersson, A. Ledin, I. Mersowsky, B.H. Svensson, *Water Res.* 37 (2003) 609.



# Development of a Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Polybrominated Diphenyl Ethers and Polybrominated Biphenyls in Water Samples

M. Polo, G. Gómez-Noya, J. B. Quintana, M. Llompart,\* C. García-Jares, and R. Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Avda de las Ciencias s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

**Solid-phase microextraction has been applied for the first time to the determination of trace concentrations of some brominated flame-retardant compounds (BFRs) in water samples. For the development of the method, six polybrominated diphenyl ethers and two polybrominated biphenyls were considered as target analytes. The factors expected to influence the extraction process are fully discussed. Quantification has been performed by gas chromatography/tandem mass spectrometry using an ion trap mass analyzer. This is also the first time that tandem mass spectrometry is applied with these analytes. Unlike conventional methods for BFR analysis, which involve solvent extraction and several cleanup steps before gas chromatography, the proposed method uses headspace extraction and hard contamination of the chromatographic system is prevented. In addition, tandem mass spectrometry provides selectivity and sensitivity in the detection process. The method performs well achieving good linearity ( $R^2 > 0.997$ ), precision, and detection limits (S/N = 3) ranging from 7.5 to 190 pg/L. The method has been applied to a variety of water samples.**

Brominated compounds have been used as flame retardants (BFRs) since the early 1970s, after the prohibition of polychlorinated biphenyls (PCBs). The most frequently used BFRs today are polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), tetrabromobisphenol A (TBBPA), and hexabromocyclododecane (HBCD). Areas of use include electronic equipment, textiles, and building materials.<sup>1</sup>

Approximately 70 brominated flame-retardant chemicals account for a global consumption of over 300 000 tons per year (1999), of which one-third are PBDEs, and another third is TBBPA.<sup>2,3</sup>

BFRs are divided into two groups: reactive BFRs, chemically bound to the polymer material, and additive BFRs, which blend

with the material. PBDEs, polybrominated biphenyls (PBBs), and HBCD are additives, whereas TBBPA is mostly used as a reactive flame retardant.<sup>4</sup>

PBDEs constitute the most widely studied group of BFRs; they have structures similar to that of the PCBs, but with an oxygen atom between the aromatic rings. The theoretical number of congeners is 209, and the numbering is analogous to the IUPAC system for numbering PCBs. In practice, not all congeners are used in commercial products. Three major commercial formulations of PBDEs are produced: decaBDE, octaBDE, and pentaBDE. Although the most frequently used BFR is decaBDE, lower brominated PBDEs are more often found in environmental samples. The fully brominated deca-BDE congener is poorly absorbed, rapidly eliminated, and thus not bioaccumulated; it is likely one of the least bioactive congeners of PBDEs. In contrast, the low molecular weight congeners, tri- to hexa-BDEs, are almost completely absorbed, slowly eliminated, and highly bioaccumulated. In addition, deca-BDE is photolytically debrominated by sunlight, as recent studies indicate.<sup>5,6</sup>

BFRs are used in a great variety of products producing a lot of waste, which constitutes the main source of these compounds in the environment. The toxicological concerns about exposure to low environmental concentrations of PBDEs focus on their potential to act as hormone disruptors, neurodevelopmental toxics, and, in some cases, carcinogenic agents. In addition, the combustion of these compounds could generate highly toxic photoproducts such as polybrominated dibenzofurans and polybrominated dibenzo-*p*-dioxins.<sup>5,7,8</sup>

To evaluate the global distribution, movement, and fate of BFRs in the environment, analytical methods are required that are sensitive, comprehensive, and interference free. A number of procedures have been reported, and recently, a comprehensive review of the analytical methods used for the determination of

\* Corresponding author. Phone: 34-981563100, ext. 14387. Fax: 34-981595012. E-mail: qblvrlgb@usc.es.

- (1) Sellström, U. Determination of some polybrominated flame retardants in biota, sediment and sewage sludge. Doctoral Dissertation, Stockholm University, Sweden, 1999.
- (2) Rahman, F.; Langford, K. H.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N. *Sci. Total Environ.* **2001**, 275, 1–17.

- (3) Manchester-Neesvig, J. B.; Valters, K.; Sonzogni, W. C. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 1072–1077.

- (4) Christensen, J. H.; Platz, J. J. *Environ. Monit.* **2001**, 3, 543–547.

- (5) McDonald, T. *Chemosphere* **2002**, 46, 745–755.

- (6) Younes, M. *The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants*; Stockholm, Sweden, 2001.

- (7) Palm, A.; Cousins, I. T.; Mackay, D.; Tysklind, M.; Metcalfe, C.; Alaei, M. *Environ. Pollut.* **2002**, 117, 195–213.

- (8) *Environmental Health Criteria 192. Flame retardants: A General Introduction*; World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland, 1994.

BFRs in the environment was published.<sup>9</sup> The range of methods available differs in their capacity to provide accurate and reproducible results. The most widely used technique to analyze samples for BFRs is gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS), using both high-resolution (HRMS)<sup>10–13</sup> and low-resolution (LRMS)<sup>14–17</sup> instruments. The LRMS techniques are most often based on negative chemical ionization, which offers higher sensitivity than electron impact ionization. Operating in HRMS has demonstrated the best selectivity and detection levels.<sup>18</sup>

Sample preparation plays an important role in the analysis of BFRs in the environmental samples because of the complexity of the matrixes and the low concentrations of these analytes. Typically, BFRs are solvent extracted from the samples, and the extracts are then purified, fractionated, and concentrated before final analysis.<sup>4,10,17,19–22</sup> Most preparation methods usually require large sample volumes, are time-consuming, and involve the use of hazardous and expensive solvents. Recently, supercritical fluid extraction<sup>23</sup> and pressurized hot water extraction<sup>24</sup> have been proposed as faster and more efficient extraction techniques.

Solid-phase microextraction (SPME) is a fast, simple, inexpensive, and solvent-free extraction technique.<sup>25</sup> It has been successfully applied to the extraction of trace levels of semivolatile organic pollutants in different environmental matrixes.<sup>26–31</sup>

The aim of this study is to analyze whether SPME is a suitable technique for the extraction of PBBs and PBDEs. In addition, GC/MS/MS is used for the first time in the analysis of these groups

of analytes, obtaining high sensitivity and selectivity. Previously, this quantification technique has been successfully applied to PCBs and related compounds.<sup>30–35</sup> Consequently, a method based on SPME and GC/MS/MS is optimized using an experimental design. The performance of the method is evaluated in terms of linearity, precision, accuracy, and limits of detection. Finally, the method is applied to the analysis of real water samples including tap water and sewage wastewater.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Reagents and Materials.** PentaBDE mixture (Pentamix) at 10 µg/mL in cyclohexane and the 4-bromophenylphenyl ether (BDE-3) at 100 µg/mL in methanol were supplied by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). The composition of this commercial pentamix was experimentally confirmed: 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) 4.1 µg/mL, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) 4.1 µg/mL, 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100) 1.2 µg/mL, 2,2',3,4,4'-pentabromodiphenyl ether (BDE-85) 0.10 µg/mL, 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether (BDE-153) 0.23 µg/mL, 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether (BDE-154) 0.34 µg/mL. 4,4'-dibromobiphenyl (PBB-15), and 2,2',4,5'-tetrabromobiphenyl (PBB-49) were supplied by Supelco (Bellefonte, PA). Isooctane stock solutions of PBB-15 and PBB-49 were prepared. Isooctane, cyclohexane, acetone, and NaCl, were all purchased from Merck (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain). All the solvents and reagents were of analytical grade. Working solutions were obtained by appropriate dilutions in cyclohexane, isooctane, and acetone and stored at –20 °C before use.

Tap water and urban wastewater samples (Santiago de Compostela, Spain) were collected in amber glass containers and maintained in the dark at 4 °C until analysis.

The SPME manual holders and fibers were obtained from Supelco. In this work, five fibers were used: 85-µm polyacrylate (PA), 100-µm poly(dimethylsiloxane) (PDMS), 75-µm Carboxen–poly(dimethylsiloxane) (CAR/PDMS), 65-µm poly(dimethylsiloxane)–divinylbenzene (PDMS/DVB), and 65-µm Carbowax–divinylbenzene (CW/DVB). The fibers were conditioned as recommended by the manufacturer.

**Experimental Setup.** Aqueous samples of different volumes were placed in headspace vials of 22 or 120 mL depending on the experiment performed. Vials were sealed with a headspace aluminum cap furnished with a Teflon-faced septum and immersed in a water bath maintained at the extraction temperature selected for the experiment (25, 50, 75, or 100 °C). Samples were let to equilibrate for 5 min before SPME. Afterward, the fiber was exposed to the headspace over the sample (or immersed into the sample) from 5 to 280 min, depending on the experiment. If agitation was required, a stir bar was introduced in the sample vial and magnetic stirring was performed during all the sampling process. Once finished the exposition period, the fiber was immediately inserted into the GC injector and the chromato-

- (9) Hyötyläinen, T.; Hartonen, K. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 13–29.
- (10) Alae, M.; Sergeant, D. B.; Ikonou, M. G.; Luross, J. M. *Chemosphere* **2001**, *44*, 1489–1495.
- (11) Choi, J.-W.; Fujimaki, S.; Kitamura, K.; Hashimoto, S.; Ito, H.; Suzuki, N.; Sakai, S.-I.; Morita, M. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 817–821.
- (12) Ikonou, M. G.; Rayne, S. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5263–5272.
- (13) Herzke, D.; Gabrielsen, G. W.; Evenset, A.; Burkow, I. C. *Environ. Pollut.* **2003**, *121*, 293–300.
- (14) Sjödin, A.; Patterson, D. G.; Bergman, A. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 3830–3833.
- (15) Strandberg, B.; Dodder, N. G.; Basu, I.; Hites, R. A. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 1078–1083.
- (16) Vetter, W. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4951–4957.
- (17) Lacorte, S.; Guillaumon, M.; Martinez, E.; Viana, P.; Barceló, D. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 892–898.
- (18) De Boer, J.; Allchin, C.; Zegers, B.; Boon, J. P. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2001**, *10*, 591–599.
- (19) Sellström, U.; Kierkegaard, A.; de Wit, C.; Jansson, B.; Asplund, L.; Bergander, L.; Bignert, A.; Odsjö, T.; Olsson, M. *Organohalogen Compd.* **1996**, *28*, 526–529.
- (20) Sellström, U.; Kierkegaard, A.; de Wit, C.; Jansson, B. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 1065–1072.
- (21) Sellström, U.; Jansson, B. *Chemosphere* **1995**, *31*, 3085–3092.
- (22) Van Bavel, B.; Sundelin, E.; Lillback, J.; Dam, M.; Lindstrom, G. *Organohalogen Compd.* **1999**, *40*, 359–362.
- (23) Kuosmanen, K.; Hyötyläinen, T.; Hartonen, K.; Riekkola, M.-L. *J. Chromatogr., A* **2002**, *943*, 113–122.
- (24) de Boer, J.; van der Zande, T. E.; Pieters, H.; Ariese, F.; Schipper, C. A.; van Brummelen, T.; Vethaak, A. D. *J. Environ. Monit.* **2001**, *3*, 386–393.
- (25) Pawliszyn, J. *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*; Wiley-VCH: New York, 1997.
- (26) Pawliszyn, J. *Applications of Solid-Phase Microextraction*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 1999.
- (27) Scheppers-Wercinski, S. A. *Solid-Phase Microextraction: A Practical Guide*; Marcel Dekker Inc.: New York, 1999; Chapter 5.
- (28) Zygmunt, B.; Jastrzebska, A.; Namiesnik, J. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, *31*, 1–18.
- (29) de Fatima Alpendurada, M. *J. Chromatogr., A* **2000**, *889*, 3–14.
- (30) Landín, P.; Llompard, M.; Lourido, M.; Cela, R. *J. Microcolumn Sep.* **2001**, *13*, 275–284.
- (31) Landín, P.; Llompard, M.; Lourido, M.; García-Jares, C.; Carro, N.; Cela, R. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 44–49.

- (32) Brochu, Ch.; Moore, S.; Hamelin, G. *Varian Application Note* **64**, March 2000.
- (33) Laučević, M.; Splendore, M.; March, R. E. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1244–1252.
- (34) Plomley, J. B.; Mercer, R. S.; March, R. E. *Organohalogen Compd.* **1995**, *23*, 7–12.
- (35) Hayward, D. G.; Hooper, K.; Andrzejewski, D. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 212–220.



Table 1. Selected GC/MS/MS Experimental Parameters and Instrumental Detection Limits

compd	start time (min)	m/z range	parent ion (m/z)	quantification ions (m/z)	isolation window (m/z)	excitation storage level (m/z)	excitation amplitude (V)	instrumental detection limits (pg)
BDE-3	5	130–260	249	141+220	3	80	1	0.1
PBB-15	8.7	140–315	312	152	5	100	2.6	0.04
PBB-49	10.5	375–480	470	389+391	9	220	1.9	0.06
BDE-47	11.70	300–500	486	324+326+328	9	230	2	0.15
BDE-100	13.5	390–580	566	404+406	11	290	1.8	0.25
BDE-99								0.33
BDE-154	16	460–650	644	482+484+486	11	340	1.85	0.56
BDE-153								0.35

graphic analysis was carried out. Desorption time was set at 2 min, and desorption temperature was 260 °C for CW/DVB, 270 °C for PDMS/DVB, 300 °C for PA, and CAR/PDMS and from 250 to 300 °C for PDMS fibers. As some of the experimental parameters were optimized by factorial design, further discussion about them will be furnished in subsequent sections.

**Instrumental Parameters.** The GC/MS/MS analyses were performed on a Varian 3800 gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA) equipped with an ion trap mass detector Varian Saturn 2000 (Varian Chromatography Systems) with a waveboard for MS/MS analysis. The system was operated by Saturn GC/MS WorkStation v5.4 software. Brominated compounds were separated on a 25 m length  $\times$  0.25 mm id, CP-Sil8 CB low bleed/MS column coated with a 0.25- $\mu$ m film. The GC oven temperature program was as follows: 60 °C hold 2 min, rate 30 °C/min to 250 °C, rate 5 °C/min to 280 °C, and hold for 8 min. Helium (purity 99.999%) was employed as carrier gas, with a constant column flow of 1.2 mL/min. The injector was operated in the splitless mode and programmed to return to the split mode after 2 min from the beginning of a run. Split flow was set at 50 mL/min. Injector temperature was between 250 and 300 °C depending on the fiber used. The mass spectrometer was operated in electron ionization mode at 70 eV. The mass range was scanned from 40 to 650 m/z at 1 s/scan for the full-scan mode. For MS/MS, all compounds were analyzed using a resonant waveform type. General parameters were as follows: multiplier offset +100, emission current 85  $\mu$ A, AGC target value 2000 counts, and trap, manifold, and transfer line temperatures were maintained at 250, 50, and 280 °C, respectively. Specific MS/MS conditions for each analyte are listed in Table 1.

## RESULTS AND DISCUSSION

**GC/MS/MS Analysis.** MS/MS conditions were optimized through automated method development implemented in the Saturn GC/MS WorkStation software. The whole molecular ion cluster was stored in the ion trap by adjusting the isolation window and further excited by a resonant waveform with same number of frequencies as the isolation window in order to maximize sensitivity and to keep the mass spectral pattern characteristic of these brominated compounds.

The main reaction pattern observed for the studied compounds (Figure 1) is the loss of two bromine atoms  $[M - 2Br]^+$  (for PBB-15, BDE-47, BDE-100, BDE-99, BDE-153, and BDE-154), as previously observed for PCBs.<sup>33</sup> However, for PBB-49 (a tetrabromobiphenyl), the main path is the loss of a single bromine atom  $[M - Br]^+$ , and for BDE-3 (a monobromodiphenyl ether),

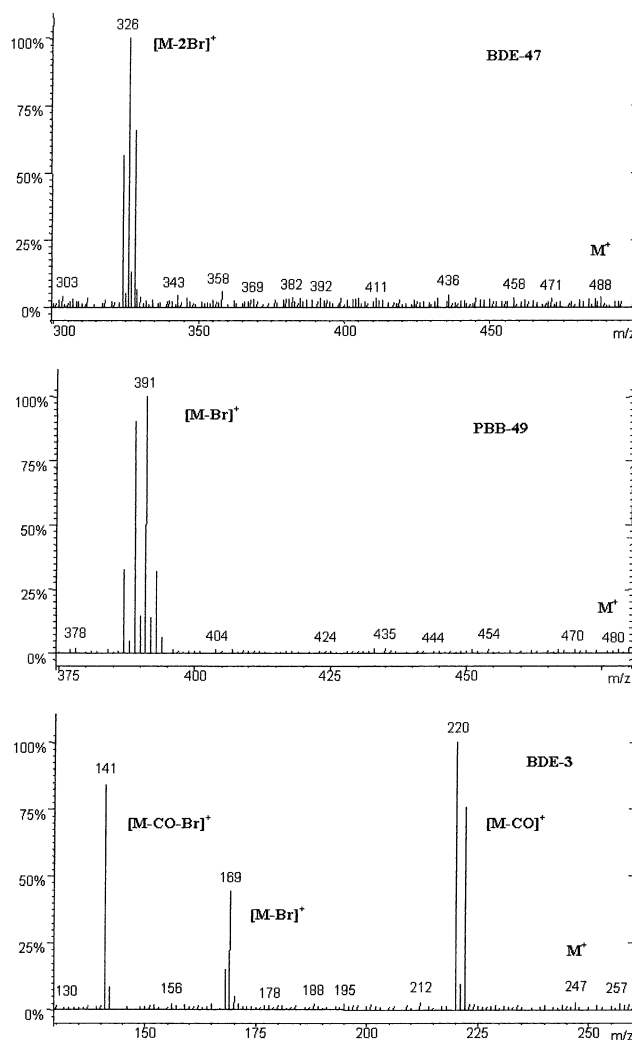


Figure 1. Mass spectral fragmentation pattern of BDE-47, PBB-49, and BDE-3.

together with the  $[M - Br]^+$  ion, two intense ions corresponding to  $[M - CO]^+$  and  $[M - COBr]^+$  are observed, in a way that resembles the dissociation pattern of PCDDs/PCDFs.<sup>34</sup>

Instrumental detection limits ( $S/N = 3$ ), obtained by direct injection of standard mixtures of the compounds, were lower than 0.1 pg for PBBs and between 0.1 and 0.56 pg for PBDEs (see Table 1).

**Factorial Design: Study of the Influence of Fiber Coating, Extraction Mode, Agitation, and Salting Out.** A factorial design was run to simultaneously evaluate several parameters affecting

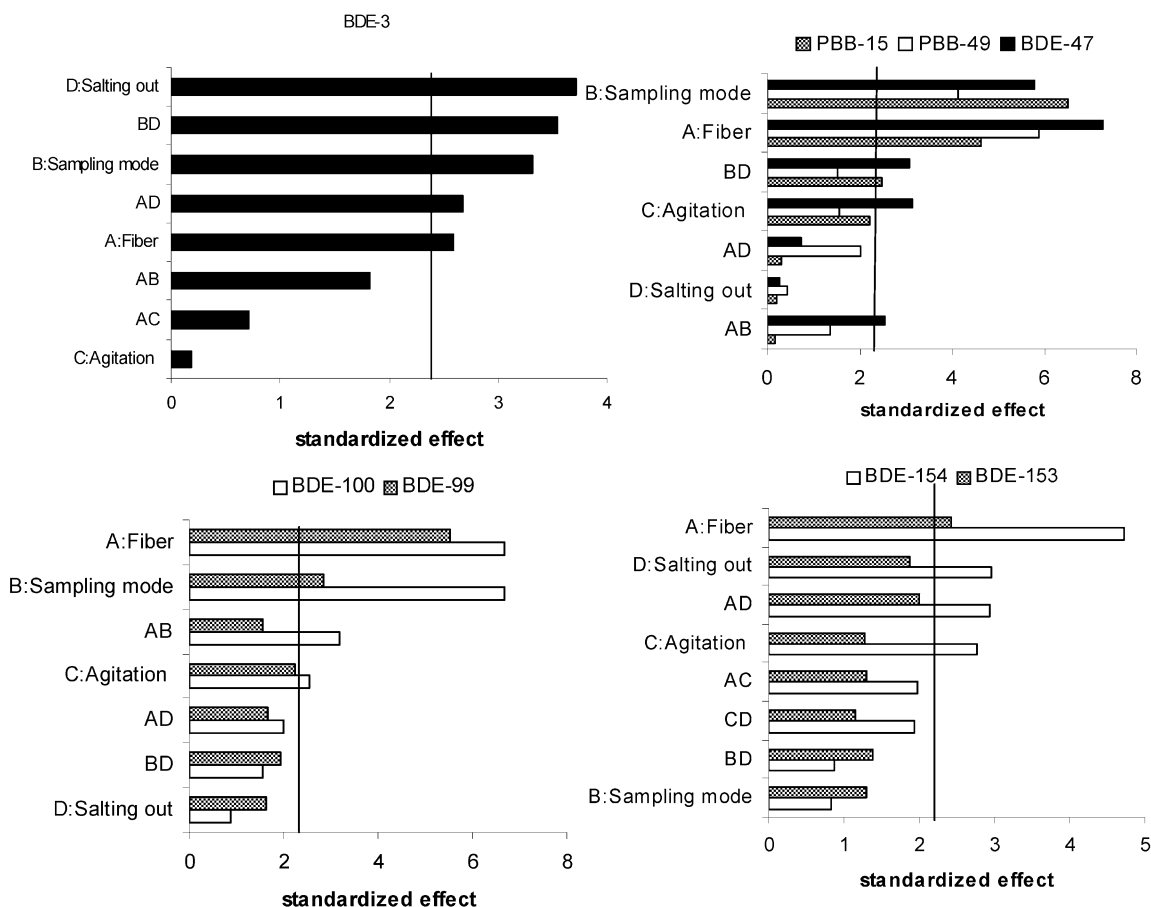


Figure 2. Standardized Pareto charts for main effects and interactions of the factorial design.

the microextraction process. Due to the fact that many factors can potentially influence extraction, a progressive strategy was used. Four experimental factors were included in the factorial design, while other factors were left for later evaluation. The factors (and levels) included in the design were as follows: (A) fiber coating (PDMS and PA); (B) extraction mode (direct SPME and HSSPME); (C) agitation of samples (no, yes); and (D) addition of salt (0 and 20%). Previously to the experimental design, preliminary experiments were run with five fibers (PDMS, PDMS/DVB, CAR–PDMS, PA, CW/DVB) and best efficiency for extraction of target analytes was obtained with PDMS and PA. The fact that target analytes were efficiently extracted with the most polar fiber of the five tested (PA) was initially surprising, but other authors have also obtained good results in the extraction of low-polarity species, such as PAHs and decachlorobiphenyl,<sup>36–38</sup> using PA fibers. This effect could be attributed to the high affinity of this polymer for aromatic compounds.<sup>38</sup> Consequently, PDMS and PA were the fibers selected for the experimental design study.

A complete factorial  $2^4$  type V resolution design involving 16 runs was selected.<sup>39</sup> This design provides the advantage of being able to study main effects as well as two-factor interactions leaving five degrees of freedom to estimate experimental error.

Table 2. Matrix of the Complete Factorial  $2^4$  Type V Resolution Experimental Design

run	fiber	sampling mode	agitation	salting out
1	PDMD	SPME	no	0
2	PA	SPME	no	0
3	PDMS	HSSPME	no	0
4	PA	HSSPME	no	0
5	PDMS	SPME	yes	0
6	PA	SPME	yes	0
7	PDMS	HSSPME	yes	0
8	PA	HSSPME	yes	0
9	PDMS	SPME	no	20
10	PA	SPME	no	20
11	PDMS	HSSPME	no	20
12	PA	HSSPME	no	20
13	PDMS	SPME	yes	20
14	PA	SPME	yes	20
15	PDMS	HSSPME	yes	20
16	PA	HSSPME	yes	20

For this experimental design, aliquots of 10 mL of spiked water (pg/mL level) were placed in 22-mL vials. The selection of temperature and time of the extractions was based on several considerations. The extraction time had to be high enough to achieve good sensitivity but short enough to allow high sample throughput. So, as the total chromatographic time was ~22 min, an extraction time of 30 min was chosen. Concerning the extraction temperature, previous experience on SPME of related compounds such as PCBs<sup>30,40</sup> indicated that 100 °C could be a good choice. For these compounds, equilibrium at room temper-

(36) Pino V.; Ayala J. H.; Afonso A. M.; González V. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 477, 81–91.

(37) Doong R.; Chang S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3647–3652.

(38) Shirey E.; Mindrup R. F. *Supelco, Sigma-Aldrich Application Note*, 1999. [<http://info.sial.com/Graphics/Supelco/objects/8000/7943.pdf>].

(39) *Statgraphics-Plus. Experimental Design. Appendix C*; Manugistics: Rockville, MD, 1996.

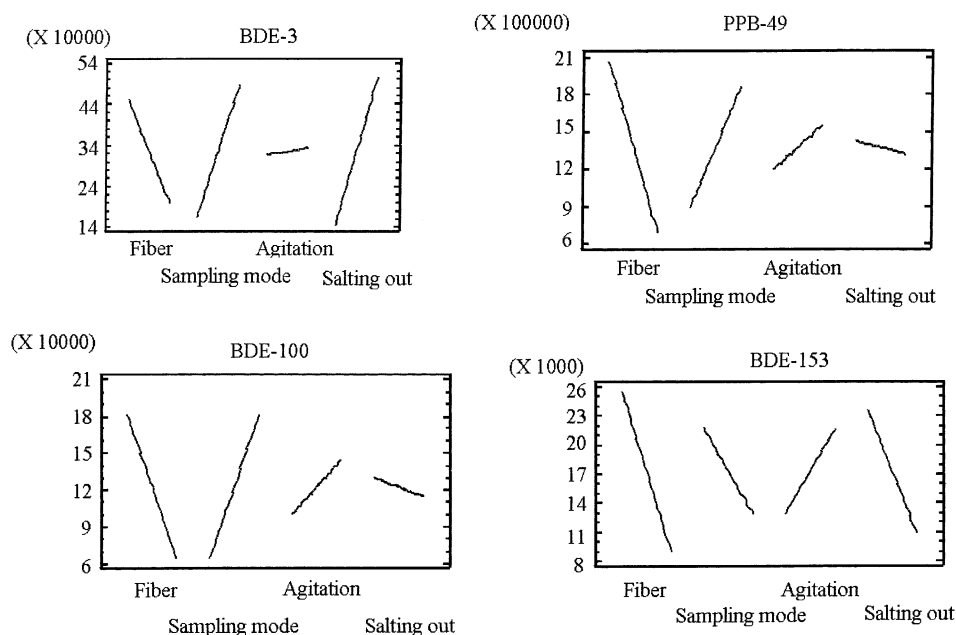


Figure 3. Graphics showing the influence of main effects on the extraction of BDE-3, PBB-49, BDE-100, and BDE-153.

ature is reached after several hours or even days, but when short extraction times are considered (i.e., compounds are far away from equilibrium), the results obtained at 100 °C are considerably higher than those obtained at 25 °C. The target compounds in this study are heavier than the corresponding PCBs with the same number of halogen substituents due to the presence of bromine atoms instead of chlorine atoms. Thus, the temperature effect should be even more noticeable. In any case, the advantage of working at high temperature for extraction of the target analytes will be demonstrated later in this paper. Therefore, extraction temperature was set at 100 °C and extraction time was 30 min. Taking into account that most of the target analytes are heavy molecules with very high boiling points, the maximum temperature recommended by the manufacturer for the desorption of PDMS fiber (280 °C) was selected. Since PA fibers can stand higher desorption temperatures, 300 °C was selected for this fiber. Desorption time was 2 min.

Table 2 shows the matrix of experiments for the design. The analysis of the results obtained after running the 16 experiments produces the standardized Pareto charts show in Figure 2. Results have been grouped into four graphs according to the behavior pattern observed for the target compounds. The length of each bar in the graphs is proportional to the absolute value of its associated standardized effect. The standardized effect is obtained by dividing the estimated effect of each factor or interaction by its standard error. The effects are displayed in decreasing order of importance, which allows easy identification of the most important factors. The interactions between factors with the lowest effects have already been removed from the Pareto charts. Figure 3 shows the main effect plots for some PBDEs, one from each group of compounds presenting behavior similar to that observed in the Pareto charts. These plots show the main effects with a line drawn between the low and the high levels for the corresponding factors. The length of the lines is proportional to the

magnitude of the effect of each factor in the microextraction process, and the sign of the slope indicates the level of the factor that produces the highest response. The salting-out effect was the most important factor affecting the extraction of BDE-3 (see Figures 2 and 3). This factor was also significant for BDE-154. However, it has the opposite effect: the addition of salt favors the extraction of BDE-3 but decreases the extraction of BDE-153. The addition of salt may change the activity coefficients of the analytes in the aqueous phase and, in this way, improve extraction efficiency. Nevertheless, the increment of the viscosity and density of the aqueous phase could negatively affect the kinetics of the process and, consequently, the extraction efficiency. In summary, the addition of salt might be favorable from a thermodynamic point of view but unfavorable from a kinetic point of view. This could explain why the extraction of the compound with fastest kinetics (BDE-3) increases, while the extraction of the compound with slowest kinetics (BDE-153) decreases. For the remaining compounds, the addition of salt shows a negative effect although it is not statistically significant. The factor fiber coating was a very important factor for all target analytes, as can be seen in the Pareto charts (Figure 2) and the low level assigned to this factor, the PDMS coating, was the most efficient one (see Figure 3). Sampling mode was also a significant factor for the extraction of most compounds (see Figure 2). Best results are obtained by employing the high level of this factor, which means sampling in headspace mode (HSSPME) (see Figure 3). However, for the hexabrominated congeners, the direct SPME improved the microextraction process although, for these compounds, this factor was not statistically significant (see Figure 2). The fact that most compounds were better extracted in the headspace mode was unexpected considering the high molecular mass and the low vapor pressures of the majority of target analytes.<sup>7</sup> Working with HSSPME provides important advantages: not only does it improve the extraction for most analytes but it also prevents contamination with nonvolatile substances while prolonging the life of the fiber.

(40) Llompart M.; Li K.; Fingas M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2510–2515.

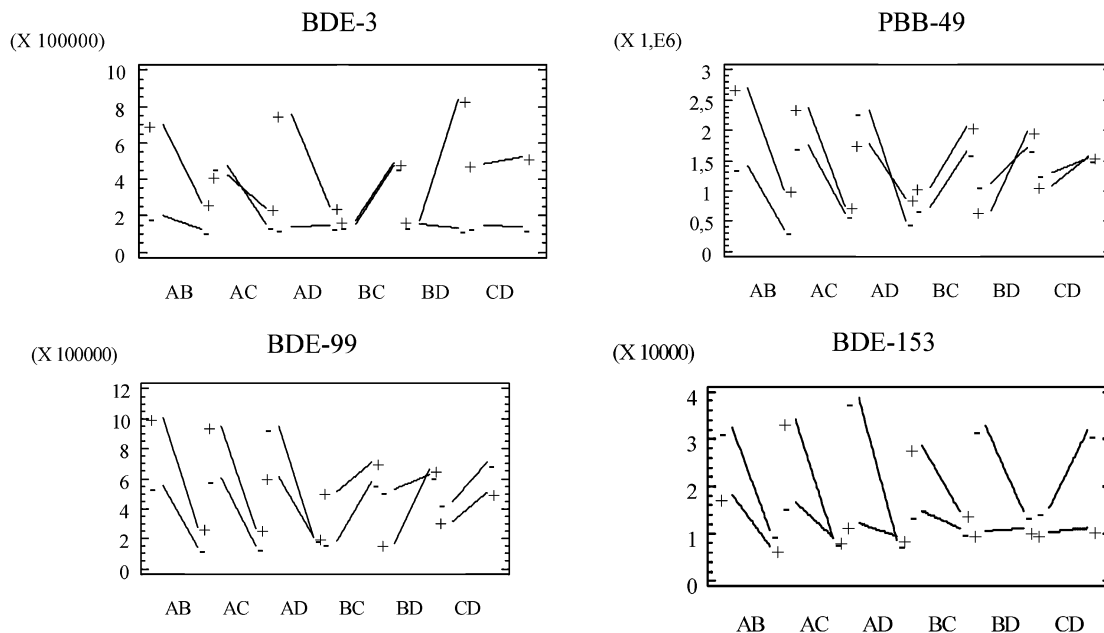


Figure 4. Interaction plots for BDE-3, PBB-49, BDE-99, and BDE-153.

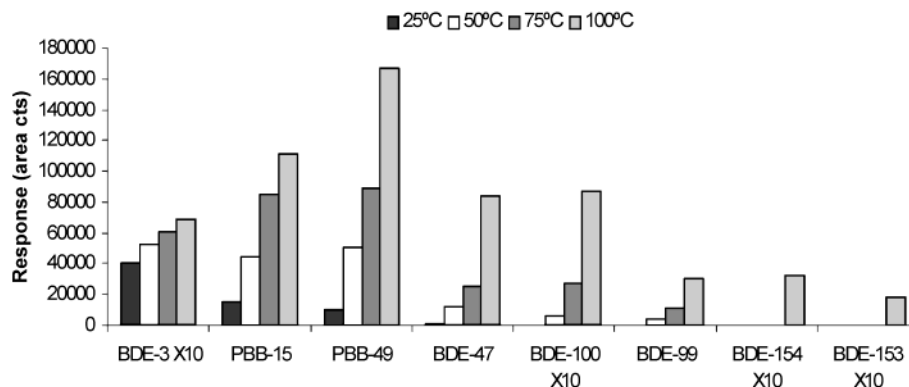


Figure 5. Effect of the extraction temperature on the response.

Agitation was an important factor, which effect was very close to the significance level for all the compounds with the exception of BDE-3. As can be seen in Figure 3, the positive slope of the lines assigned to this factor indicates that extraction is favored by stirring the samples.

Some interaction effects were also significant. The interaction plots for the analytes are shown in Figure 4. The interaction between sampling mode and addition of salt (BD) was significant for some of the analytes. For BDE-3, the addition of salt produced a noticeable increase in the response when sampling in headspace mode, while in direct sampling, this factor was not significant. For PBB-15, PBB-49, BDE-47, BDE-99, and BDE-100, the lines that define the interaction are crossed, indicating that the addition of salt has a negative effect for direct sampling but it has a slightly positive effect or noneffect for HSSPME. For the hexabrominated compounds, the effect of this factor was negative sampling in both modes. From a thermodynamic point of view, the effect of salt should be independent of the other factors studied. Therefore, kinetic aspects must be responsible for these interaction effects. From this perspective, it is reasonable to think that the addition of salt in direct sampling mode could more significantly slow the kinetics of the process than in headspace sampling mode. The interaction effect observed could thus be explained.

The interaction between fiber and addition of salt (AD) was significant for BDE-3 and was significant or very close to the significance level for the most brominated congeners. For BDE-3, the addition of salt enhances the response obtained for both fibers. For the rest of compounds, the response obtained with PDMS (the low level of the factor fiber) is higher when no salt is added to the sample. For PA fiber (the high level of the factor fiber), the addition of salt is less important but for some compounds has a positive, although not-significant effect.

The interaction between fiber and sampling mode (AB) was significant for two of the analytes (BDE-47, BDE-100), but even for those compounds, the lines in the charts (Figure 4) are not crossed, and for both fibers, HSSPME gave higher responses with the exception of hexabrominated congeners for which direct extraction was more efficient.

The working conditions selected after considering the above results require using PDMS fibers, sampling the headspace, and stirring the samples. Salt addition is not necessary.

**Evaluation of Other Experimental Parameters.** Some experiments were performed to study other factors not included in the design such as extraction temperature, sample volume, and extraction time.

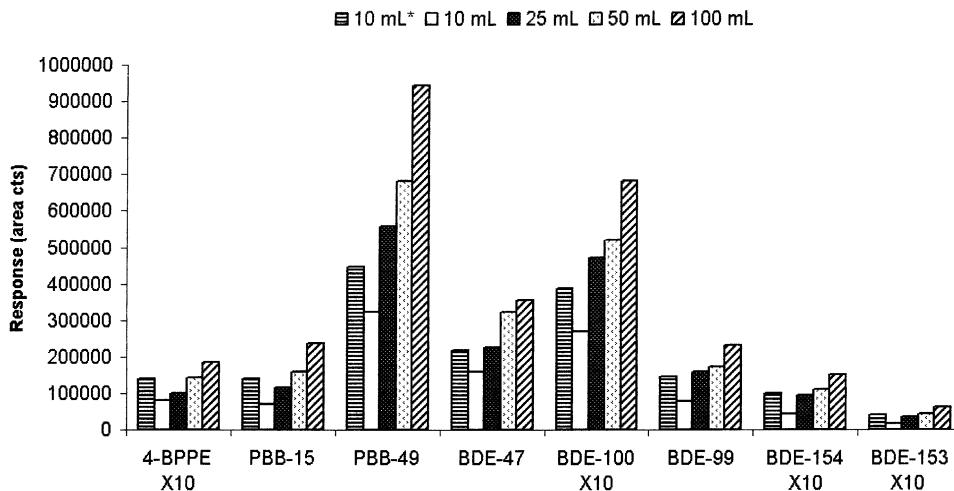


Figure 6. Effect of sample and headspace volumes on the response (\*vial size, 22 mL).

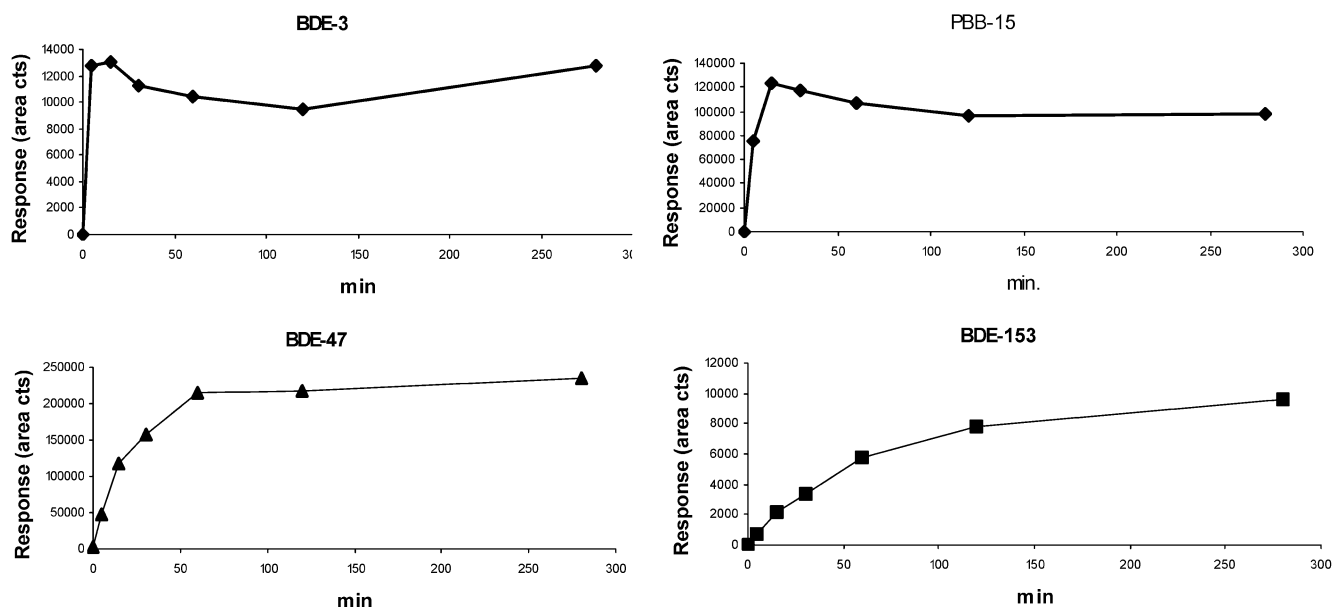


Figure 7. Extraction time profiles for BDE-3, PBB-15, BDE-47, and BDE-153.

In the microextraction process, the extraction temperature is a critical factor, especially for semivolatile compounds such as PBDEs and PBBs. Up to now, all the experiments were carried out at 100 °C, and it must be confirmed that this temperature is the most suitable for the extraction of the target compounds. The 10-mL water samples were spiked at the picogram per milliliter level and extracted during 30 min at 25, 50, 75, and 100 °C. To not exceed the pressure limits of the glass vials, higher temperatures were not investigated. Responses obtained were plotted versus temperature for each compound and are shown in Figure 5. For all compounds, the higher the temperature, the better the response achieved, especially for the highly brominated congeners. Moreover, for the hexabrominated compounds, a quantifiable response was only achieved at 100 °C. At 25 °C, responses obtained for all the analytes were quite low, indicating the slow kinetics of the extraction process at low temperatures, with the exception of BDE-3 for which the temperature was not a very relevant factor.

Finally, the effect of headspace volume and of sample volume were studied. The effect of phase volume in SPME is very complex

and strongly dependent on the partition constants.<sup>41–43</sup> It affects both the kinetics and the thermodynamics of the SPME, and in consequence, its complexity is even higher when the system is not under equilibrium conditions. Considering only thermodynamic aspects, the increment of the headspace volume could decrease response if the capacity of this phase is important or not affect the response if capacity of this phase is negligible. On the other hand, the sensitivity of the SPME procedures is proportional to the amount of analyte in the sample and it is expected that increasing sampling volume will augment response. However, according to SPME theory, if sample volume becomes significantly larger than fiber and headspace capacities (i.e., infinite volume is reached), no enhancement of the responses can be achieved by increasing the volume of sample.<sup>25</sup>

Different experiments were performed varying the sample volume from 10 to 100 mL in vials of 120 mL. In addition,

(41) Langelfeld J. J.; Hawthorne S. B.; Miller D. J. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 144–155.

(42) Gorecki T.; Pawliszyn J. *Analyst* **1997**, *122*, 1079–1086.

(43) Gorecki T.; Khaled A.; Pawliszyn J. *Analyst* **1998**, *123*, 2819–2824.

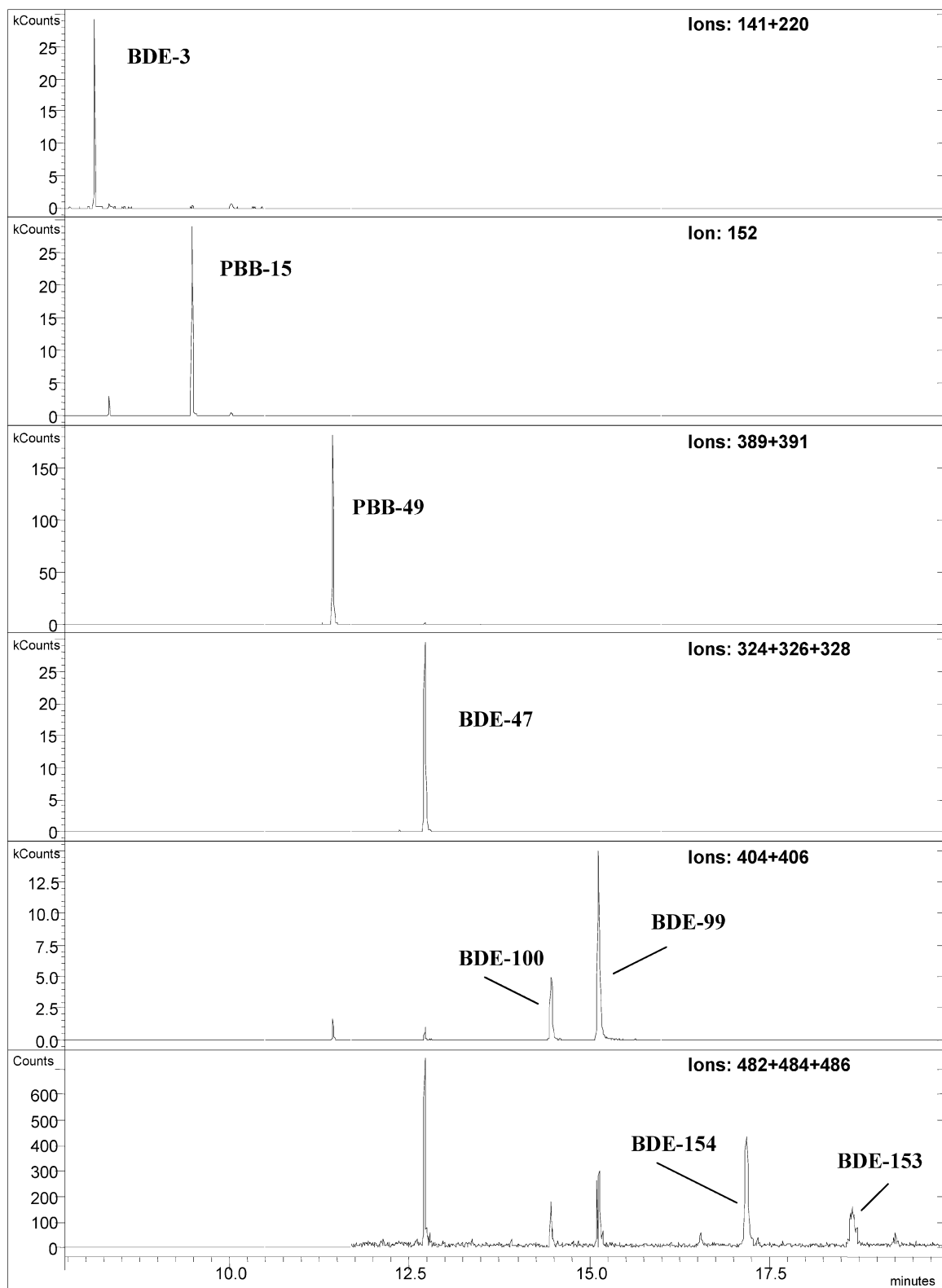


Figure 8. Ion chromatograms of an influent wastewater sample (for spike levels, see Table 5).

experiments with 10 mL of water in vials of 22 mL were also carried out. Results are shown in Figure 6. The two first bars for each compound correspond to the response obtained using the same volume of sample (10 mL) and different volume of headspace, 12 and 110 mL, respectively. As can be seen, responses obtained for all analytes were lower in the experiment with higher

headspace volume. In the other experiments shown in Figure 6 (third, fourth, and fifth bars), the sample volume was increased to 25, 50, and 100 mL using the 120-mL vials. In consequence, in these experiments, the sample volume increases and the headspace volume decreases. As can be seen, the response increases when the sample volume increases. But when comparing the



Table 3. Linearity and Limits of Detection of the Proposed Method

compds	concn ranges (pg/mL)	correlation factor ( $R^2$ )	detection limits (S/N = 3, pg/L)
BDE-3	1.00–498	0.9977	190
PBB-15	1.01–503	1.000	9.0
PBB-49	0.95–476	1.000	7.5
BDE-47	0.41–205	0.9998	20
BDE-100	0.12–60	1.000	60
BDE-99	0.41–205	0.9999	47
BDE-154	0.34–17	1.000	150
BDE-153	0.23–12	0.9995	100

results obtained for the extraction of 10 mL using 22-mL vials with the ones obtained for the extraction of 100 mL using 120-mL vials (first and fifth bars in Figure 6), the responses are only ~30% lower for most of the compounds using the low sample volume. Considering that one of the first objectives of this study is the development of a method that used a small amount of sample and generated the minimum amount of residues, a volume of 10 mL employing 22-mL vials was selected.

To investigate the sorption behavior of PBDEs and PBBs in the fiber, different extraction times (0, 5, 15, 30, 60, 120 min and 280 min) were selected for the analysis of water samples spiked at the picogram per milliliter level.

The extraction time profiles were established by plotting the detector response versus the extraction time. As shown in the kinetic curves (Figure 7), the time required for reaching equilibrium is directly related to the number of bromine substituents in the compounds. BDE-3 reaches equilibrium conditions in a few minutes exposure while equilibrium time for PBB-15 is 15 min and the variability observed in responses after reaching equilibrium (10–13%) can be attributed to the variability of the method (~10%). For BDE-47, BDE-99, and BDE-100, a 60-min exposure is necessary to reach equilibrium, and last, BDE-154 and BDE-153 do not reach equilibrium within 280 min of exposure, although from the shape of the curves equilibrium must be very close to being reached.

**Performance Evaluation of the Proposed Method.** After analyzing all experimental results, the following conditions have been selected to evaluate the performance of the method: PDMS fiber, headspace sampling mode, 10-mL sample volume, 100 °C extraction temperature, sample stirring, and 30-min extraction time.

Linearity, repeatability, and detection limits have been evaluated in order to assess the performance of the microextraction method. Results are shown in Tables 3 and 4.

The calibration study was performed using spiked water samples. The concentration range is shown in Table 3. Each level of concentration was analyzed in duplicate or triplicate. Calibration curves were linear in the range studied for each compound. As can be seen in Table 3, the correlation factor ( $R^2$ ) values were higher than 0.997 for all of the compounds (with the exception of BDE-3), so a directly proportional relationship between the extracted amount of compounds and the initial concentration in the sample was demonstrated.

The precision of the experimental procedure was also evaluated at two different concentration levels by calculating the relative standard deviation (RSD) of three replicates of each level (Table

Table 4. Repeatability at Two Concentration Levels for the Proposed Method

compds	concn (pg/mL)	repeatability (RSD %, $n = 3$ )	concn (pg/mL)	repeatability (RSD %, $n = 3$ )
BDE-3	10.0	4.4	199	6.3
PBB-15	10.1	3.8	201	12
PBB-49	9.5	2.8	190	1.7
BDE-47	4.1	17	82	1.2
BDE-100	1.2	15	24	10
BDE-99	4.1	20	82	9.3
BDE-154	0.34	24	6.8	9.3
BDE-153	0.23	26	4.6	8.8

Table 5. Recovery of the Target Compounds (Expressed as Percentages) from Three Real Water Samples

compds	tap water		effluent wastewater		influent wastewater	
	spiked concn (pg/mL)	recovery $\pm$ RSD (%)	spiked concn (pg/mL)	recovery $\pm$ RSD (%)	spiked concn (pg/mL)	recovery $\pm$ RSD (%)
BDE-3	1.00	99 $\pm$ 1	10.0	100 $\pm$ 4	199	106 $\pm$ 10
PBB-15	1.01	97 $\pm$ 4	10.1	92 $\pm$ 2	201	90 $\pm$ 6
PBB-49	0.95	90 $\pm$ 21	9.5	94 $\pm$ 1	190	93 $\pm$ 5
BDE-47	0.41	91 $\pm$ 8	4.1	97 $\pm$ 7	82	87 $\pm$ 7
BDE-100	0.12	100 $\pm$ 4	1.2	83 $\pm$ 17	24	95 $\pm$ 4
BDE-99	0.41	87 $\pm$ 19	4.1	90 $\pm$ 12	82	92 $\pm$ 8
BDE-154	0.034	nd	0.34	100 $\pm$ 25	6.8	74 $\pm$ 11
BDE-153	0.023	nd	0.23	117 $\pm$ 13	4.6	82 $\pm$ 11

4). At the lower level, the RSD values were between 3.8% at 10 pg/mL for PBB-15 and 26% at 0.23 pg/mL for BDE-153, and between 1.2% at 82 pg/mL for BDE-47 and 12% at 201 pg/mL for PBB-15, in the higher level. Detection limits (based on a signal-to-noise ratio of 3) were from 7.5 to 190 pg/L (see Table 3).

The microextraction procedure was applied to three real samples: tap water and effluent and influent wastewater samples from an urban treatment plant. The HSSPME analyses of these samples did not show initial detectable concentration of PBDEs and PBBs; therefore, they were suitable for recovery investigations.

Samples were filtered and spiked to give the concentrations summarized in Table 5. After checking that a matrix effect did not occur, the samples were quantified using external standard calibration. Recoveries obtained for each type of sample are given in this table. As can be seen, recoveries were satisfactory for the target compounds in all the samples studied. Figure 8 shows the chromatogram obtained for the influent wastewater sample.

#### ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the projects REN2000-09841HID and BQU2002-01944 from CICYT (Spanish Commission for Research and Development, Ministerio de Ciencia y Tecnología) and the project PGIDT01PXI23701PN from the Xunta de Galicia (Consellería de Medioambiente). M.P. and J.B.Q. acknowledge the Xunta de Galicia and the Spanish Ministerio de Educación, respectively, for their doctoral grants.

Received for review August 7, 2003. Accepted November 13, 2003.

AC030292X

# New approach based on solid-phase microextraction to estimate polydimethylsiloxane fibre coating–water distribution coefficients for brominated flame retardants

Maria Polo, Vanessa Casas, Maria Llompart\*, Carmen García-Jares, Rafael Cela

*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain*

Available online 30 June 2006

## Abstract

A depletion solid-phase microextraction (SPME) method based on multiple SPME extraction was applied to estimate fibre coating–water distribution constants ( $K_{fs}$ ) of brominated flame retardants. Several polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) including compounds present in the commercial mixture “Pentamix”, and two polybrominated biphenyls (PBBs) were considered as target analytes. One hundred-micrometer poly(dimethylsiloxane) (PDMS) coating fibre was selected to estimate partition coefficients. SPME kinetics studies at 25 and 100 °C were performed.  $K_{fs}$  values obtained at both temperatures for brominated flame retardants were compared with the corresponding octanol–water partition coefficients ( $K_{ow}$ ) values found in literature. A linear log–log relationship between  $K_{ow}$  with  $K_{fs}$  was found. To the best of our knowledge, this is the first study where brominated flame retardants  $K_{fs}$  values are estimated.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Solid-phase microextraction; Brominated flame retardants; Microextraction coefficients; Octanol–water partition coefficients; Polybrominated diphenyl ethers; Polybrominated biphenyls

## 1. Introduction

Solid-phase microextraction (SPME) was first introduced in 1990 by Arthur and Pawliszyn as analytical technique [1]. SPME, mainly coupled to gas chromatography (GC), has been successfully applied for the analysis of organic pollutant in different matrices [2], such as the well-known polychlorinated biphenyls (PCBs), polyaromatic hydrocarbons (PAHs), pesticides, etc. [3–6]. More recently, the SPME technique has been used for the analysis of new concerning groups of pollutants such as brominated flame retardants [7].

Apart from the development of analytical methods, SPME has been applied in other research areas, as measuring bioavailable rather than total concentration of analyte in different matrices [8–15], biomimetic studies [16] and determining polymer coating/extraction matrix partition coefficients ( $K_{fs}$ ) [17–22]. In this way, several studies have attempted to establish a correlation between water microextraction coefficients ( $K_{fs}$ ) and

octanol–water partition coefficients ( $K_{ow}$ ) [23–25]. Traditional techniques used to estimate  $K_{ow}$ , based mainly on slow-stirring methods, are extremely tedious [25–28]; so, SPME could constitute a simple alternative to measure lipophilicity and potential bioaccumulation of organic compounds, if a correlation between  $K_{fs}$  and  $K_{ow}$  is demonstrated.

Although the relationship between  $K_{fs}$  and  $K_{ow}$  has been demonstrated for analytes having low molecular weights, no consensus exists for more hydrophobic organic compounds [21–23,25]. These problems result partly from inappropriate experimental procedures as discussed in several studies [19,20,24,29]. The long equilibrium time, the losses by volatilization and adsorption onto recipient surfaces, as well as, the difficulty to dissolve very hydrophobic compounds in water and to keep them in true solution appear to be the main causes of the above-mentioned problems [30].

On other hand, for determining  $K_{fs}$  values, a precise estimation of the amount of compound extracted by the fibre is required. This is usually done by liquid injection calibration [13,21,25,29]. In this case, sample transfer into the GC column by both direct solvent injection and SPME fibre injection should be complete; nevertheless, liquid injection is influenced

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 563100x14225; fax: +34 981 595012.  
E-mail address: [qblvrlgb@usc.es](mailto:qblvrlgb@usc.es) (M. Llompart).



by different factors such as the expansion associated with the solvent vaporization, which could cause analyte loss if injection method is not optimized [31]. On-column injection is the configuration which provides the best results [32]. A quantitation alternative is the multiple extractions approach. That was firstly used for quantitative determination of volatile organic compounds in complex matrices by direct headspace injection in the gas chromatograph [33]. This approach has also been used for SPME quantitation [34–36]. Depending on the partition coefficient of the compounds, it is possible to deplete the sample by doing multiple extractions of the same vial and the analyte amount can be determined by the depletion peak areas curve after extrapolation to exhaustive extraction [37]. This method have been used for the determination of water–PDMS partition coefficients, by Urruty and Montury [38] and Zimmermman et al. [39] using direct immersion SPME, and by Nardi using in-tube SPME [40].

Brominated flame retardants are a new group of contaminants, which have received special attention in the last years. Several compounds make up the brominated flame retardant group and some of them are polybrominated diphenylethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PBBs). Little is still known about their effect on human health, although toxic effects upon animals have been detected. So, there is a need for further investigations on physical–chemical properties of these compounds, with the aim to know their potential distribution, bioaccumulation and toxicity within the environment.

In the present study, the water–poly(dimethylsiloxane) (PDMS) partition coefficients ( $K_{fs}$ ) of several brominated flame retardants, including seven PBDEs and PBBs have been estimated and their correlation with  $K_{ow}$  has been studied. As the best of our knowledge,  $K_{fs}$  values for PBDEs and PBBs have not yet been determined. A depletion SPME method based on multiple SPME extraction as a self-calibration method was applied to estimate  $K_{fs}$  at 25 and 100 °C. Obtained  $\log K_{fs}$  at 100 °C values ranged from 3.47 to 5.21. At 25 °C, it was only possible to estimate  $\log K_{fs}$  values for four compounds, BDE-3, PBB-15, PBB-49 and BDE-47, and they ranged from 4.23 to 6.05.  $\log K_{fs}$  values for brominated flame retardants were compared with the  $\log$  octanol–water partition coefficients ( $\log K_{ow}$ ) found in literature. Since a linear  $\log$ – $\log$  relationship between  $\log K_{ow}$  and  $\log K_{fs}$  was found, the feasibility of the SPME technique to estimate lipophilicity and potential bioaccumulation of brominated flame retardants has been demonstrated.

### 1.1. Theoretical background of the depletion method

In this study, a static quantification strategy based on multiple SPME extraction of the same sample was adopted. For theoretical considerations, the extraction efficiency ( $\alpha$ ) proposed by Urruty and Montury [38] was considered. It represents the proportion of the analyte extracted by the fibre ( $n_{f1}$  for the first extraction) versus the analyte initially present in the sample ( $n_{s0}$ ) and only depends on both the polymeric coating and the analyte:

$$n_{f1} = \alpha n_{s0} \quad (1)$$

being  $\alpha$  for a three phases equilibrium system ( $\alpha_{eq}$ ):

$$\alpha_{eq} = \frac{K_{fs} V_f}{K_{hs} V_h + K_{fs} V_f + V_s} \quad (2)$$

$V_f$ ,  $V_s$  and  $V_h$  are the volumes of the fibre coating, the sample and the headspace above the sample, respectively, while  $K_{fs}$  is the partition coefficient between the fibre coating and the aqueous sample and  $K_{hs}$  is the partition coefficient between the sample and the headspace. In this case, headspace capacity was deemed insignificant compared with aqueous phase capacity based on the Henry's law constant values of the target compounds [41].

After the first extraction, the amount of analyte remaining in the sample ( $n_{s1}$ ) can be calculated as a proportion of its initial amount ( $n_{s0}$ ):

$$n_{s1} = n_{s0} - n_{f1} = n_{s0} - \alpha n_{s0} = n_{s0}(1 - \alpha) \quad (3)$$

By running several consecutive  $x$  extractions, the decrease in the extracted amount of analyte can be determined by the following general equation [39]:

$$n_{sx} = n_{s0}(1 - \alpha)^x \quad (4)$$

Using this equation, the amount of analyte in the sample decreases exponentially according to previously published by Arthur et al. [37].

Regarding to the amount extracted by the fibre, it can be defined by the following relationship between two consecutive extractions:

$$\begin{aligned} n_{fx} &= n_{sx-1} - n_{sx} = n_{s0}(1 - \alpha)^{x-1} - n_{s0}(1 - \alpha)^x \\ &= n_{s0}\alpha(1 - \alpha)^{x-1} \end{aligned} \quad (5)$$

A similar expression can be written in terms of chromatographic response, according to the linear relationship between SPME response and initial concentration in the sample [7]:

$$A_x = A_T\alpha(1 - \alpha)^{x-1} \quad (6)$$

where  $A_x$  is the observed chromatographic signal (peak area) for the extraction  $x$  and  $A_T$  (total area) is the signal obtained if the whole analyte initially present in the sample was extracted.

Eq. (6) can be rewritten in logarithmic form [39]:

$$\log(A_x) = \log(A_T\alpha) + (x - 1)\log(1 - \alpha) \quad (7)$$

Therefore, plotting  $\log A_x$  versus the number of extractions ( $x - 1$ ) results in a linear regression, and the extraction efficiency ( $\alpha$ ) can be easily determined from the slope of the equation  $\log(1 - \alpha)$ .

In this way, under equilibrium conditions partition coefficients ( $K_{fs}$ ) can be calculated from Eq. (2) using only  $\alpha_{eq}$  as a variable independent of the detector response for each compound, and without knowledge of the initial concentration in the sample:

$$K_{fs} = \frac{\alpha_{eq} V_s}{(1 - \alpha_{eq}) V_f} \quad (8)$$

The time required to reach SPME equilibrium at room temperature for high molecular weight compounds, such as PBBs

and PBDEs, is very long and the risk of losses due to degradation or adsorption onto glass walls of the vials might become significant.

According to Ai [42], the amount of analyte extracted by PDMS fibre can be related to the extraction time by an exponential equation since the SPME process occurs via a first order diffusion of the compounds between the fibre coating and the water phase:

$$n_{ft} = n_{feq}(1 - e^{-bt}) \quad (9)$$

This equation can also be expressed as chromatographic responses (peak area):

$$A_t = A_{eq}(1 - e^{-bt}) \quad (10)$$

being  $A_{eq}$  the obtained response at equilibrium and  $b$ , a kinetic constant related to the type of polymeric coating, the analyte and the sample volume.

Dividing Eq. (9) by  $n_{s0}$ :

$$\frac{n_{ft}}{n_{s0}} = \left( \frac{n_{feq}}{n_{s0}} \right) (1 - e^{-bt})$$

and taking into account Eq. (1), the following equation is obtained:

$$\alpha_t = \alpha_{eq}(1 - e^{-bt}) \quad (11)$$

being  $\alpha_t$  the extraction efficiency obtained at the extraction time  $t$ . Eq. (8) can be rearranged to calculate  $K_{fs}$ , since:

$$\alpha_{eq} = \frac{\alpha_t}{1 - e^{-bt}}$$

obtaining the expression:

$$K_{fs} = \frac{\alpha_t V_s}{(1 - e^{-bt} - \alpha_t)V_f} \quad (12)$$

Therefore,  $K_{fs}$  can be estimated using the depletion method (under non-equilibrium conditions) to calculate  $\alpha_t$  (Eq. (7)) and the extraction kinetics to obtain  $b$  (Eq. (10)) by fitting the extraction time profiles.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

4-Bromophenylphenyl ether (BDE-3) at 100 µg/mL in methanol was supplied by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenylether (BDE-47), 2,2',4,4',5-pentabromodiphenylether (BDE-99), 2,2',4,4',6-pentabromodiphenylether (BDE-100), 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenylether (BDE-153) and 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenylether (BDE-154) were purchased to Wellington Laboratories (Ontario, Canada) at 50 µg/mL in nonane. 2,2',3,4,4'-Pentabromodiphenylether (BDE-85) at 50 µg/mL in isooctane was from AccuStandard (New Haven, USA). 4,4'-Dibromobiphenyl (PBB-15) and 2,2',4,5'-tetrabromobiphenyl (PBB-49) were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Isooctane stock solutions of PBB-15 and PBB-49 were prepared. Isooctane, cyclohexane, acetone and NaCl, were all

purchased to Merck (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain). All solvents and reagents were of analytical grade. Working solutions were obtained by appropriate dilutions in cyclohexane, isooctane and acetone and stored at  $-20^\circ\text{C}$  before use. Spiked water solutions were prepared by adding different volumes of acetone solutions (between 10 and 100 µL) containing the target analytes. The content of organic solvent in the sample was kept as low as possible (below 0.5%) and constant, since variations in the composition may influence the partitioning of the analytes. Spiked solutions were let to stabilize for 12–20 h, without stirring, at  $4^\circ\text{C}$  until the analysis.

The SPME manual holders and fibres were obtained from Supelco. In this study, 100-µm poly(dimethylsiloxane) fibres were used. The fibres were conditioned as recommended by the manufacturer.

### 2.2. Experimental SPME procedure

Aliquots of Milli-Q water spiked at pg/mL concentration level were poured in headspace vials. Vials were sealed with a headspace aluminium cap furnished with a PTFE-faced septum and immersed in a water bath maintained at the extraction temperature selected for the experiment (25 or  $100^\circ\text{C}$ ). Samples were let to equilibrate for 5 min, before placing the SPME device (a 100 µm PDMS fibre in a manual holder). Afterwards, the fiber was exposed to the headspace over the sample (or directly immersed into the water sample) for the selected time, depending on the experiment. When agitation was applied, a metal stir bar was introduced in the vial and magnetic stirring was performed during all the sampling process. Kinetic studies were carried out from 0 to 240 min at  $100^\circ\text{C}$ , and from 0 to 8 days at  $25^\circ\text{C}$ .

Depletion experiments at 25 and  $100^\circ\text{C}$  were carried out by running five consecutive extractions from a single water sample.

After extraction, the fibre was immediately inserted into the GC injector and GC-MS/MS analysis was carried out. Desorption time was set at 5 min and desorption temperature was  $280^\circ\text{C}$ .

### 2.3. Instrumental parameters

GC-MS/MS analyses were performed on a Varian 3800 gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) equipped with an ion trap mass detector Varian Saturn 2000 with a waveboard for MS-MS analysis. The system was operated by Saturn GC-MS WorkStation v5.4 software. Brominated compounds were separated on a 25 m length  $\times$  0.25 mm i.d., CP-Sil8 CB Lowbleed/MS column coated with a 0.25 µm film. The GC oven temperature program was:  $60^\circ\text{C}$  hold 2 min, rate  $30^\circ\text{C}/\text{min}$  to  $250^\circ\text{C}$ , rate  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  to  $280^\circ\text{C}$ , hold for 8 min. Helium (purity 99,999%) was employed as carrier gas, with a constant column flow of 1.2 mL/min. Injector was operated in the splitless mode and programmed to return to the split mode after 2 min from the beginning of a run. Split flow was set at 50 mL/min. Injector temperature was between 250 and  $300^\circ\text{C}$  depending on the fibre used. The mass spectrometer was operated in the electron ionization (EI) mode. The

mass range was scanned from 40 to 650  $m/z$  at 1 s/scan for the full scan mode. For MS–MS, all the compounds were analysed using a resonant waveform type. General parameters for ionization mode were: multiplier offset +100, emission current 80  $\mu$ A and AGC target value was 2000 counts. Trap, manifold and transfer line temperatures were 250, 50 and 280 °C, respectively. Specific MS–MS conditions for each analyte are published elsewhere [7].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preliminary SPME experiments based on liquid injection quantification

Some experiments were conducted in order to evaluate the feasibility of liquid injection to quantify SPME injection. Five milliliters of water samples containing 200 pg/mL of seven PBDEs and two PBBs, including one mono- (BDE-3), one di- (PBB-15), two tetra- (BDE-47 and PBB-49), three penta- (BDE-100, BDE-99 and BDE-85) and two hexa-brominated congeners (BDE-154 and BDE-153), were extracted at 100 °C for 30 min. The amounts of analytes extracted by PDMS fibre were calculated by liquid injection calibration using standard solutions in isooctane (1  $\mu$ L injection volume). The extraction efficiencies calculated as the ratio of the amount of analyte found (given by the liquid injection calibration curve) to the amount added, are showed in Table 1. Extraction efficiencies close to 100% were obtained for some compounds, which means that almost the total amount of analyte present in the sample is extracted in a single extraction. A reextraction was carried out to verify that only a little amount of analyte remained in the sample. Nevertheless, the SPME extraction efficiencies obtained in this second extraction were around 30–40% for all compounds (Table 1). Considering the two extractions of the same sample, the calculated amount of extracted analyte was higher than 100% for most compounds (Table 1). Therefore, it is obvious that the amount of analyte extracted by SPME is overestimated using liquid injection calibration. This fact indicates that sample transfer efficiency into the GC system is different for both direct solvent and SPME fibre injection, being liquid injection less efficient. Some parameters affecting liquid injection such as the solvent type (isooctane and hexane) and splitless time (from 0.5 to 5 min) were tested in order to improve the sample transfer efficiency, but no significant influence was observed on the response.

Other factors, such as the inner diameter of the liner, the temperature of the injector [32] and the injection volume [43] have been found critical factors to calibrate SPME by liquid injection and they could be also considered. In a recent paper about the influence of the injection technique and the column system on GC determination of PBDEs, it was demonstrated that the GC injection and separation of BDE congeners is subjected to discrimination and that precision decreased when non-optimal chromatographic conditions are selected. In this study, on-column injection was found to provide the highest response [44].

Considering these facts, an alternative strategy based on a depletion procedure, which do not imply liquid injection calibration, will be employed to estimate  $K_{fs}$  values of brominated flame retardants.

#### 3.2. Determination of $K_{fs}$ by depletion SPME

The estimation of  $K_{fs}$  values requires to prevent all possible losses of analytes due to adsorption effects since these experimental artifacts could lead to erroneous results. Therefore, first experiments were performed in order to check the absence of losses by adsorption. In these experiments, 100 mL water sample containing the target analytes at 100 pg/mL were poured into three 120 mL volume size vials. A stirring bar was placed in each vial and samples were extracted at 100 °C, as it was described in Section 2, for 1, 2 and 8 h, respectively. At the end of the exposure time, the glassware walls and the stirring bar were rinsed with hexane in an ultrasonic bath, and the rinsates were collected. Then, an aliquot of the rinsates was directly injected and other aliquot (5 mL) was concentrated to 100  $\mu$ L previously to the injection. None of the target compounds were detected by direct injection of the rinsates, but BDE-47, BDE-100 and BDE-99 were detected in the concentrated rinsates. Adsorption losses varied from 0.6 to 2.8% for the detected compounds, and were considered as not significant on the total mass balance of the SPME procedure.

Once confirming no adsorption onto glassware materials, depletion experiments were carried out by running cumulative extractions from a water sample using a 100- $\mu$ m poly(dimethylsiloxane) fibre. This fibre was selected among available commercial fibres since the absorption hypothesis into liquid polymeric fibre coating was demonstrated by Mayer et al. by fluorescence microscopy images [24] and it allows

Table 1  
Overestimation of the SPME extraction efficiency by liquid injection calibration (see text for more details)

	Compound								
	BDE-3	PBB-15	PBB-49	BDE-47	BDE-100	BDE-99	BDE-85	BDE-154	BDE-153
Initial amount of analyte in the sample (ng)	0.47	0.83	0.69	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2
Amount of analyte extracted (ng)	0.10	0.56	0.73	1.1	1.1	1.1	0.91	0.98	0.92
Efficiency of SPME (%)	22	66	105	98	92	94	81	82	76
Amount of analyte in reextraction (ng)	0.07	0.24	0.16	0.42	0.49	0.50	0.44	0.41	0.36
Efficiency of reextraction (%)	16	29	23	36	41	43	39	34	30
Total efficiency (%)	38	95	128	134	133	137	120	116	106

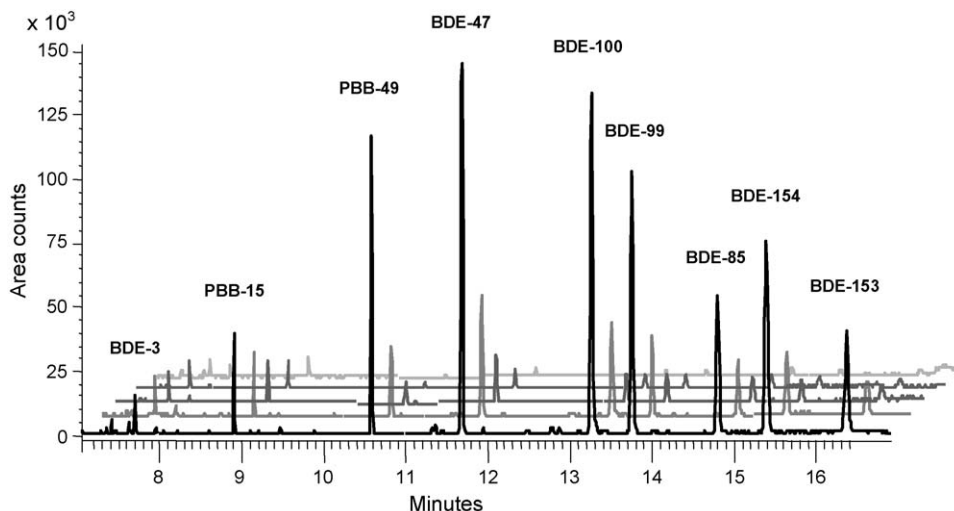


Fig. 1. TIC SPME-GC-MS/MS chromatograms of a sample (extraction conditions: 100 °C, PDMS coating, 2 h) after the first to fifth extraction (in grey decrease scale).

assuming a non-competitive and concentration-independent sorption mechanism [19].

First depletion experiments were performed at 100 °C. A single sample (10 mL) spiked at 200 pg/mL was extracted sampling the headspace (10 mL) for 2 h and then the fibre was injected in the chromatographic system. After that, the fibre was newly placed in the vial to perform the next extraction. Chromatograms of five subsequent extractions of the same sample are merged in Fig. 1. As can be seen, the peak areas of each compound decrease from extraction to extraction, but different depletion behaviours between the target compounds can be observed. For example, while the peak area of PBB-49 is larger than that of PBB-15 at the first extraction, in the second extraction the peak area for both compounds is similar. Fig. 2A shows the depletion curves for the target compounds by plotting peak areas versus the number of extractions ( $x$ ) - 1. An exponential decay of the responses is observed for most compounds according to Eq. (6). This decrease in the signal is due to a decrease in the amount of analyte remaining in the sample. As can be seen in the figure, for most compounds, the sample is significantly depleted after five extractions, so multiple extraction could be used as a quantitative technique with a few number of extractions. These differences between the target compounds are more plausible plotting logarithmical peak areas as shown in Fig. 2B. According to Eq. (7), the extraction efficiency ( $\alpha_{t=2h}$ ) for each compound can be obtained from the line slope. Together with the slopes, calculated  $\alpha_{t=2h}$  and linear regression coefficients ( $r^2$ ), are summarized in Table 2. The obtained results fit well with a first order linear model obtaining  $r^2 > 0.99$  for most analytes. Regarding extraction efficiency ( $\alpha_{t=2h}$ ), the lowest values were obtained for the lowest brominated analytes, BDE-3 and PBB-15. As can be seen in Fig. 2A, the depletion of the amount of these two compounds was not as clearly noticed after consecutive extractions as for the rest of the compounds. Extraction efficiency was higher for the highest brominated compounds, for which between 50 and 70% of analyte amount was transferred to the fibre after only one extraction. This fact explains the high sen-

sitivity obtained for the analysis of PBDEs and PBBs by SPME [7].

Partition coefficient ( $K_{fs}$ ) can be easily derived from  $\alpha_{eq}$  according to Eq. (8) if the system is under equilibrium conditions, or employing  $\alpha_t$  by Eq. (12) if the system has not reached equilibrium. In this second case, the kinetic constant ( $b$ ) is included in the equation.

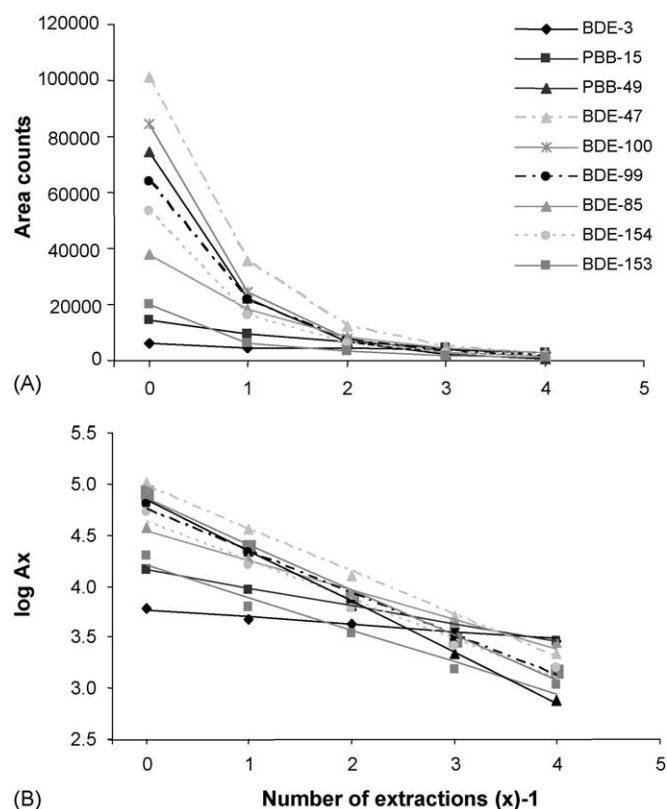


Fig. 2. Depletion experiment at 100 °C. (A) Decrease in peak area with the number of extractions and (B) log (peak area) vs. number of extractions. Results were fitted by Eqs. (6) and (7), respectively.



Table 2

Slopes, calculated  $\alpha$ , linear regression coefficients ( $r^2$ ) and  $\log K_{fs}$  values obtained from depletion experiments at 100 °C

Compound	Slope ( $1 - \alpha$ )	Regression coefficients ( $r^2$ )	Extraction efficiency ( $\alpha_{t=2h}$ )	$\log K_{fs}$
BDE-3	$-0.07 \pm 0.01$	0.978	$0.15 \pm 0.01$	3.47
PBB-15	$-0.18 \pm 0.01$	0.994	$0.34 \pm 0.01$	3.91
PBB-49	$-0.50 \pm 0.02$	0.998	$0.68 \pm 0.01$	4.55
BDE-47	$-0.43 \pm 0.03$	0.999	$0.63 \pm 0.01$	4.47
BDE-100	$-0.43 \pm 0.02$	0.995	$0.63 \pm 0.01$	4.73
BDE-99	$-0.40 \pm 0.03$	0.991	$0.60 \pm 0.01$	4.81
BDE-85	$-0.31 \pm 0.02$	0.994	$0.51 \pm 0.02$	4.77
BDE-154	$-0.38 \pm 0.03$	0.990	$0.58 \pm 0.03$	5.21
BDE-153	$-0.32 \pm 0.03$	0.987	$0.51 \pm 0.03$	—

In order to study if the system is under equilibrium conditions, a kinetic study was carried out from 0 to 240 min. Fig. 3 shows the extraction time profiles obtained for some representative compounds. As can be seen, less brominated compounds, including mono-, di- and tetra-congeners, reach the equilibrium conditions in 2 h. However, penta- and hexaBDEs did not reach equilibrium within 4 h, although they seem to be very close to this condition. Eq. (10) gives a good fit of kinetic curves ( $r^2 > 0.99$ ) and thus allows obtaining the kinetic constant ( $b$ ). The logarithms of  $K_{fs}$  calculated by Eq. (8) for the compounds that had reached equilibrium in 2 h ( $\alpha_{eq} = \alpha_{t=2h}$ ) and by Eq. (12) for the target compounds that had not reached equilibrium (penta- and hexaBDEs) are also given in Table 2. They ranged from 3.47 to 5.21.  $K_{fs}$  values increased with the hydrophobicity of the compounds, which is determined by the bromine substitution degree; so, the highest brominated compounds present the highest  $K_{fs}$  values underlining their high affinities to PDMS coating. No decrease of  $K_{fs}$  values was observed for molecular weight increase confirming that only absorption mechanisms control the partitioning of high molecular weight analytes from water to PDMS fibre as published in previous studies [20,24].

The depletion procedure at 100 °C was repeated with different PDMS fibres, under same SPME and chromatographic conditions, several months after the first experiment in order to check the reproducibility of the proposed approach. No significant differences have been observed for the extraction efficiency ( $\alpha$ ) and  $K_{fs}$ .

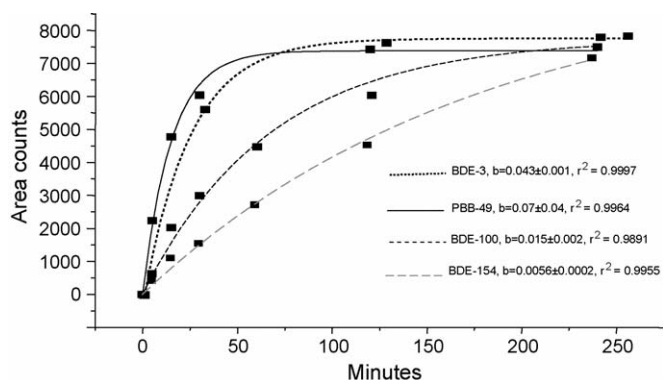


Fig. 3. Curve fitted extraction time profiles for some representative target compounds at 100 °C.

These experiments performed at 100 °C demonstrated the applicability of the depletion method in the estimation of  $K_{fs}$  values.

The depletion procedure was also carried out at 25 °C by direct sampling and the extraction time selected between consecutive extractions was 24 h. The total number of extractions was five. Fig. 4A shows the depletion curves for some representative compounds by plotting peak areas versus the number of extractions ( $x - 1$ ). An exponential decay of the responses is observed for low molecular weight analytes according to Eq. (6), while for high brominated compounds (penta- and hexaBDEs), the decrease on the response is not as noticeable. By plotting logarithmical peak areas as shown in Fig. 4B, the depletion is

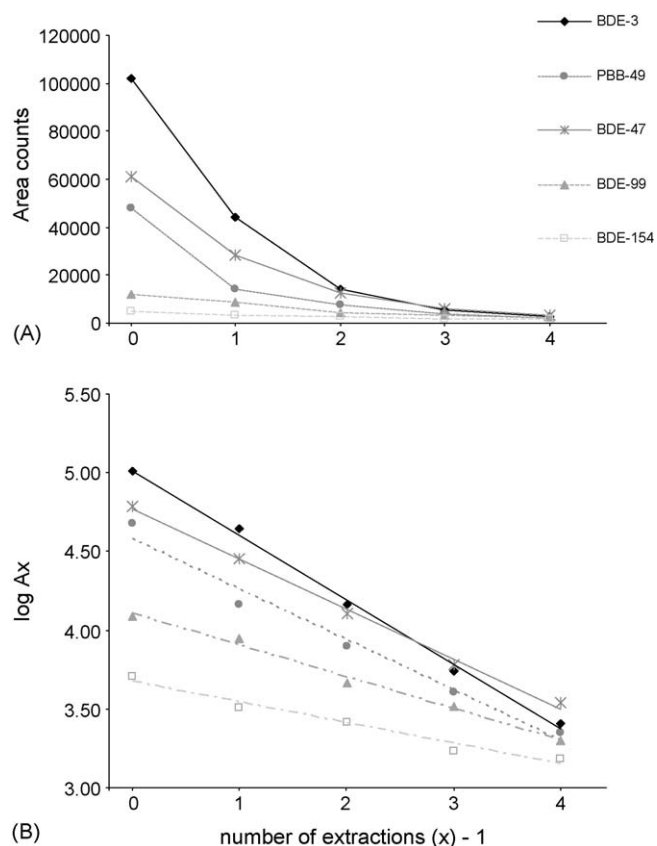


Fig. 4. Depletion experiment at 25 °C for representative compounds. (A) Decrease in peak area with the number of extractions and (B) log (peak area) vs. number of extractions. Results were fitted with Eqs. (6) and (7), respectively.

Table 3

Calculated  $\alpha$ , linear regression coefficients ( $r^2$ ) and  $\log K_{fs}$  values obtained from depletion experiments (24 h) at 25 °C

Compound	Slope ( $1 - \alpha$ )	Regression coefficients ( $r^2$ )	Extraction efficiency ( $\alpha_{t=24\text{ h}}$ )	$\log K_{fs}$
BDE-3	$-0.41 \pm 0.01$	0.997	$0.61 \pm 0.02$	4.23
PBB-15	$-0.544 \pm 0.003$	0.991	$0.71 \pm 0.02$	5.20
PBB-49	$-0.32 \pm 0.03$	0.977	$0.52 \pm 0.01$	5.86
BDE-47	$-0.32 \pm 0.01$	0.996	$0.52 \pm 0.01$	6.05
BDE-100	$-0.20 \pm 0.01$	0.991	$0.37 \pm 0.03$	—
BDE-99	$-0.20 \pm 0.01$	0.990	$0.37 \pm 0.03$	—
BDE-85	$-0.24 \pm 0.01$	0.995	$0.42 \pm 0.02$	—
BDE-154	$-0.14 \pm 0.03$	0.967	$0.26 \pm 0.03$	—
BDE-153	$-0.18 \pm 0.03$	0.927	$0.35 \pm 0.03$	—

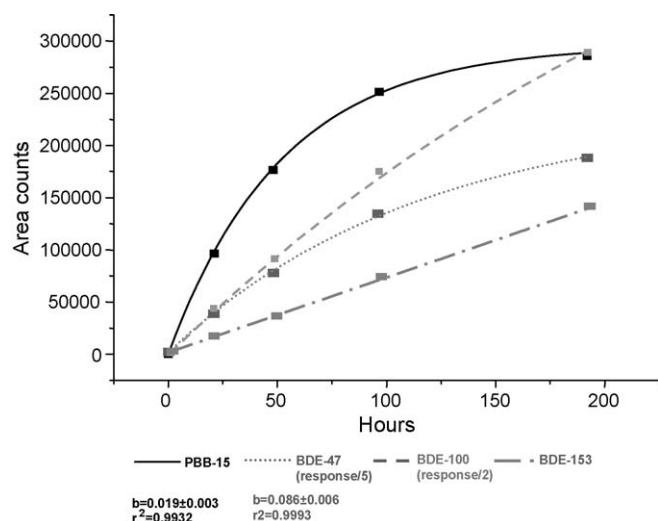


Fig. 5. Curve fitted extraction time profiles for some representative target compounds at 25 °C.

better visualized. According to Eq. (7), the extraction efficiency ( $\alpha_{t=24\text{ h}}$ ) for each compound can be obtained from the line slope. In order to study if the system is under equilibrium conditions, extraction time profiles were also obtained at 25 °C analyzing spiked water samples from 0 to 8 days. Fig. 5 shows the extraction time profiles obtained for some representative compounds. At room temperature, none of the compounds reached equilibrium within 8 days, with the exception of BDE-3 and PBB-15, so the calculation of the kinetic constant ( $b$ ) is necessary to estimate  $K_{fs}$  for all compounds. However, Eq. (10) gave only a good

fit of the kinetic curves for low brominated compounds (mono-, di- and tetra-congeners), which reach the equilibrium within 8 days or are close to this condition. Kinetic profiles could not be properly fitted for high brominated compounds since they are very far of equilibrium. The experimental time needed to reach equilibrium for these compounds is too high (probably several weeks) and it could lead to erroneous data since the stability of the sample is not guaranteed; therefore, longer extraction times were not tested in order to avoid possible experimental artifacts.  $K_{fs}$  at 25 °C were only estimated for BDE-3, PBB-15, PBB-49 and BDE-47 by Eq. (12). In Table 3, the slopes of the depletion at 25 °C, calculated  $\alpha_{t=24\text{ h}}$ , correlation coefficients of the linear regression and logarithms of  $K_{fs}$  calculated for these compounds are summarized. At this temperature,  $\alpha_{t=24\text{ h}}$  expressed as percentage ranged from 38 to 70%.  $K_{fs}$  obtained for BDE-3, PBB-15, PBB-49 and BDE-47 were higher than the ones at 100 °C. Absorption in the fibre is an exothermic process, so in equilibrium conditions, when temperature increases, the distribution constant decreases [2]. Therefore, the effect of the temperature in  $K_{fs}$  is ascertained with the obtained results.  $K_{fs}$  values also increase with the hydrophobicity of the compounds as observed at 100 °C.

As for these compounds partition coefficient data are not available, the values obtained in the present study were compared with  $K_{fs}$  for PCBs (see Table 4).  $K_{fs}$  values for homologous PCB congeners increase with halogenated degree. This increasing trend is in good agreement with our values for the brominated compounds. However, a progressive underestimation is observed for high chlorinated compounds in one of the PCB studies [22], which might be due to inappropriate experi-

Table 4

Comparison of  $\log K_{fs}$  values obtained for PCBs and target PBDEs and PBBs

Number of substitutions	$\log K_{fs}$				
	PCBs <sup>a</sup>	PCBs <sup>b</sup>	PCBs <sup>c</sup>	BFRs at 100 °C	BFRs at 25 °C
Di	5.11	—	4.65	3.91	5.20
Tetra	5.49–5.80	5.38	5.14	4.47–4.45	5.86–6.05
Penta	5.61–5.73	5.71–5.89	5.48	4.73–4.81	—
Hexa	5.44–5.52	6.16–6.28	6.01	5.21	—

<sup>a</sup> Results from reference [22].<sup>b</sup> Results from reference [24].<sup>c</sup> Results from reference [25].

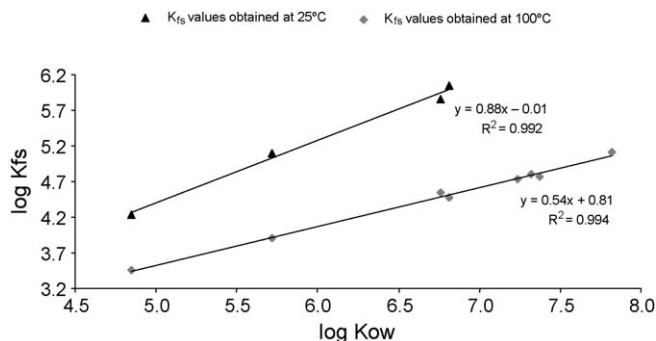


Fig. 6. Experimentally determined octanol–water partition coefficients ( $K_{ow}$ ) by Braekvelt et al. [28] vs. partition coefficients ( $K_{fs}$ ) obtained in this study for the target compounds at 25 and 100 °C.

mental procedures as discussed in Section 1. This fact underlines that depletion procedure could be a more accurate alternative than traditional techniques to estimate partition coefficients.

### 3.3. Correlation between $\log K_{fs}$ – $\log K_{ow}$

$K_{ow}$  is frequently used as measure of bioaccumulation and, therefore, toxicity of organic compounds. In last years, the SPME method has been developed to rapidly estimate  $K_{ow}$  since partition coefficients between polymeric phase and water resemble octanol–water partitioning. Several authors have studied the correlation between  $\log K_{fs}$  and  $\log K_{ow}$ , in order to use  $\log K_{fs}$  to predict the environmental fate of pollutants [21–25]. A large variability in the results obtained was observed; some authors achieved a good correlation in all the range of  $K_{ow}$  [24] or only when  $\log K_{ow} < 6$  [14,20], and other authors obtained a poor correlation between the coefficients in all the range [19,25]. In the present study, a regression analysis of  $\log K_{fs}$  and  $\log K_{ow}$  for brominated flame retardants target compounds was carried out. The  $\log K_{ow}$  values for PBDEs were taken from a recent study in which  $K_{ow}$  values of nine PBDEs were directly measured using a slow-stirring technique [28]. This process is more labour-intense than SPME. In fact, more than 2 months were needed to obtain the result.  $\log K_{ow}$  values of the target BDE compounds ranged from 6.81 for BDE-47 to 7.90 for BDE-153, and were related to bromine content of the compounds as mentioned before for  $\log K_{fs}$  values obtained in this study. PBBs  $K_{ow}$  values were taken from Pijnenburg et al. [45].

$K_{fs}$  and  $K_{ow}$  values fit quite well with a first order linear model for both 25 and 100 °C as can be seen in Fig. 6. The correlation coefficient are for both temperatures very high ( $r^2 > 0.99$ ), and the slope at 25 °C is close to the unity, which means that partition coefficients ( $K_{fs}$ ) could be used to evaluate compounds bioavailability in the environment. Therefore, it can be concluded the partition coefficient ( $K_{fs}$ ) is as suitable as  $K_{ow}$  value to estimate the concentration of organic compounds in animal lipid tissues (lipid surrogate).

### Acknowledgements

This research was supported by the projects BQU2003-02090 from CICYT, Spanish Commission for Research

and Development (Ministerio de Ciencia y Tecnología) and PGIDIT04PXIC23701PN from Xunta de Galicia. M.P. and V.C. would like to acknowledge the Xunta de Galicia and the Fundación Gil Dávila, respectively, for their doctoral grants.

### References

- [1] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [2] J. Pawliszyn, *Applications of Solid-Phase Microextraction*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- [3] S.A. Scheppers-Wercinski, *Solid-Phase Microextraction: A Practical Guide*, Marcel Dekker, New York, 1999 (Chapter 5).
- [4] M. Sakamoto, T. Tsutsumi, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 63.
- [5] Y. Yang, D.J. Miller, S.B. Hawthorne, *J. Chromatogr. A* 800 (2) (1998) 257.
- [6] P. Landín, M. Llompарт, M. Lourido, C. García-Jares, A. Carro, R. Cela, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 44.
- [7] M. Polo, G. Gómez-Noya, J.B. Quintana, M. Llompарт, C. García-Jares, R. Cela, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1054.
- [8] P. Mayer, *Partitioning based approaches to study exposure and effects of hydrophobic organic substances*, Doctoral Thesis, University of Utrecht, The Netherlands, June 2000.
- [9] S. Lee, J. Gan, W.P. Liu, M.A. Anderson, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5597.
- [10] E.U. Ramos, S.N. Meijer, W.H.J. Vaes, H.J.M. Verhaar, J.L.M. Hermens, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3430.
- [11] D. Lambropoulou, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 215.
- [12] W. Chen, K.F. Poon, H.W. Lam, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3816.
- [13] R.U. Holt, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 107.
- [14] J. Hall, M. Satterfield-Doerr, R. Parikh, S. Brodbelt, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1788.
- [15] B.I. Escher, M. Berg, J. Mühlemann, M.A.A. Schwarz, L.M. Hermens, W.H.J. Vaes, R.P. Schwarzenbach, *Analyst* 127 (2002) 42.
- [16] A. Leslie Heather, J.P. Oosthoek, J.M. Busser, H.S. Kraak, L.M. Hermens, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 229.
- [17] P.A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 402.
- [18] P. Pollien, D. Roberts, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 183.
- [19] B. Shurmer, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3660.
- [20] R. Doong, S.M. Chan, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3467.
- [21] I. Valor, M. Pérez, C. Cortada, D. Apraiz, J.C. Molto, G. Font, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 39.
- [22] E.Y. Zeng, D. Tsukada, J.A. Noblet, J. Peng, *J. Chromatogr. A* 1066 (2005) 165.
- [23] Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y. Liu, M.L. Lee, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1866.
- [24] P. Mayer, W.H.J. Vaes, J.L.M. Hermens, *Anal. Chem.* 72 (2000) 459.
- [25] A. Paschke, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 35.
- [26] J.H.M. de Bruijn, F. Busser, W. Seinen, J. Hermens, *Environ. Toxicol. Chem.* 8 (1989) 499.
- [27] A.G. van Haelst, P.F. Hessen, F.W.N. van der Wielen, H.A.J. Govers, *Chemosphere* 29 (1994) 1651.
- [28] E. Braekvelt, S.A. Tittlemier, G.T. Tomy, *Chemosphere* 51 (2003) 563.
- [29] J. Dugay, C. Miegé, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 27.
- [30] J. Poerschmann, T. Górecki, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3824.
- [31] K. Grob, *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [32] G. Ouyang, Y. Chen, L. Setkova, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 9.
- [33] S. Kolb, *Chromatographia* 15 (1982) 587.
- [34] O. Ezquerro, B. Pons, M.T. Pena, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 247.
- [35] Z. Penton, *SPME, Application Note 17*, Varian, Bellefonte, PA, 1995.
- [36] D. de la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzar, C. Hurlbeck, C. Bartzsch, K.H. Feller, *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 784.
- [37] C.L. Arthur, M.L. Killam, K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1960.

- [38] L. Urruty, M. Montury, J. Chromatogr. Sci. 37 (1999) 277.
- [39] T. Zimmermman, W.J. Ensinger, T.C. Schmidt, J. Chromatogr. A 1102 (2006) 51.
- [40] L. Nardi, J. Chromatogr. A 985 (2003) 39.
- [41] S.A. Titlemier, T. Halldorson, G.A. Stern, G.T. Tomy, Environ. Toxicol. Chem. 21 (2002) 1804.
- [42] J. Ai, Anal. Chem. 69 (1997) 179.
- [43] L. Tuduri, V. Desauziers, J.L. Fanlo, J. Microcol. Sep. 12 (2000) 550.
- [44] J. Björklund, P. Tollbäck, C. Hiärne, E. Dyremark, C. Östman, J. Chromatogr. A 1041 (2004) 20.
- [45] A.M.C.M. Pijnenburg, J.W. Evets, J. de Boer, J.P. Boon, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 141 (1995) 1.



# Development of a solid-phase microextraction method for the analysis of phenolic flame retardants in water samples

Maria Polo, Maria Llompart\*, Carmen Garcia-Jares, Guadalupe Gomez-Noya, Maria-Herminia Bollain, Rafael Cela

*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain*

Available online 5 April 2006

## Abstract

A solid-phase microextraction (SPME) method for the ultra-trace determination of brominated phenols in aqueous samples has been developed and is reported for the first time to the best of our knowledge. 3,5,3',5'-tetrabromobisphenol A (TBBPA), the most widely used brominated flame retardant, and other phenolic flame retardants in commercial use, such as 2,4-dibromophenol (2,4-DBP), 2,4,6-tribromophenol (TBP) and pentabromophenol (PBP) have been included as target analytes. The analytical procedure involves the in situ acetylation-SPME and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) determination of the target analytes. A multi-factor categorical experimental design was created to study the main parameters affecting the extraction efficiency, allowing also the evaluation of interaction effects between factors. The factors studied were type of fiber, extraction mode, exposing the fiber directly into the sample (DSPME) or into the headspace over the sample (HSSPME), and extraction temperature. Carboxen-polydimethylsiloxane (CAR-PDMS) fiber appeared to be the most suitable of the five fibers tested for the extraction of most compounds, excluding PBP and TBBPA for which polydimethylsiloxane (PDMS) was the most efficient coating. The highest response was achieved for both fibers sampling in headspace mode at 100 °C. In order to test the linearity of the method, calibration studies were performed with both CAR-PDMS and PDMS coatings. For both fibers, the method was linear in a range of 2 orders of magnitude, giving relative standard deviation (RSD%) below 10% for most compounds and detection limits at the low pg/mL level. In addition, the feasibility of the method for simultaneous determination of chlorinated and brominated phenols was studied. Finally, the method was applied to several real samples including tap water and effluent and influent waste water samples from an urban treatment plant, in which several phenolic compounds, such as phenol, methylphenols and chlorophenols, could be detected and quantified.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Factorial design; Water analysis; Waste water; Solid-phase microextraction; Headspace analysis; Bromophenols; Tetrabromobisphenol A; Tetrachlorobisphenol A; Phenols; Chlorophenols; Methylphenols

## 1. Introduction

Flame retardants are a group of structurally diverse compounds added to plastic materials to impede or suppress the combustion process. Some of them in commercial use are phenolic compounds, such as 2,4-dibromophenol (2,4-DBP), 2,4,6-tribromophenol (TBP), pentabromophenol (PBP), 3,5,3',5'-tetrabromobisphenol A (TBBPA) and 3,5,3',5'-tetrachlorobisphenol A (TCBPA) [1]. 2-Bromophenol (2-BP), 2,4-dibromophenol (2,4-DBP), 2,6-dibromophenol (2,6-DBP)

and TBP may be formed as by-products in the decomposition of plastics containing TBBPA [2].

The application of flame retardants is very diverse, resulting in different sources, transport routes and environmental concentrations. Industries applying phenolic flame retardants (such as textile, electronic and car producers) and consumers, are potential sources of the release of these compounds in the environment, as well as, waste sites, recycling stations and sewage treatment plants [1].

Concerning exposure of general population to phenolic flame retardants, it may occur through inhalation of contaminated air or through the diet [3–5]. Although knowledge on toxicity of phenolic flame retardants and by-products is still limited, some of them (TBP, PBP and TBBPA) have shown to be strong

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 563100x14225; fax: +34 981 595012.  
E-mail address: [qblvrlgb@usc.es](mailto:qblvrlgb@usc.es) (M. Llompart).

competitors for thyroxin binding to transthyretin (endocrine disruptors) [6,7].

Several national regulatory bodies have implemented regulations on flame retardants, and some brominated phenolic compounds (2,4-DBP, TBP, PBP and TBBPA derivatives) have been listed on the US EPA Office of Pollution Prevention and Toxics (OPPT) master testing list (MTL) [8]. In 2000, TBBPA was included as one of priority substances for risk assessment and this scientific evaluation is currently ongoing. The adoption of the final EU risk assessment report and additional studies on potential effects of TBBPA on the aquatic and soil compartments are in course [9]. Thus, since phenolic flame retardants are suspected to be harmful to the environment and humans, they need to be monitored.

Most investigations on the presence of flame retardants in environmental samples have been focused on the study of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) [10–12]. Nevertheless, only few studies have been conducted to determine halogenated phenolic retardants, although it has been demonstrated that brominated phenols and TBBPA are compounds presenting high  $K_{ow}$  and then, high lipophilicity, in spite of their relatively high solubility in water [13]; both characteristics can promote their distribution in the environment. TCBPA and TBBPA have been investigated in water [14,15], and in soil, sediment and sewage sludge [16–21]. The presence in water of some brominated phenols, such as 2-BP, 4-BP, 2,4-DBP, 2,6-DBP and TBP has also interest since they are responsible for plastic or medicinal tastes in chlorinated drinking waters [22].

Regarding analytical methodologies, both liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) [21,23] and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) [17,24,25] have been applied for the determination of some brominated phenols. In the case of GC analysis, derivatization with diazomethane has been applied to improve chromatographic separation of compounds [26]. Capillary electrophoresis has also been used for the analysis of brominated phenols in water [14,27]. Regarding sample preparation, extraction techniques based on solvent extraction [16,21,28] and solid-phase extraction [23,26] have been used. In general, these techniques are characterized by the use of toxic organic solvents and time-consuming multi steps generally including concentration and clean up of the extracts. These problems can be overcome by solid-phase microextraction (SPME) that offers fast and efficient extraction methods without solvent consumption, less risk of sample contamination and often higher selectivity. SPME is easily coupled with GC techniques since extracted analytes are thermally desorbed by introducing the SPME device into the injector of the GC system [29].

SPME has been successfully applied to analyze brominated flame retardants, such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybromobiphenyls (PBBs) [30] and phenolic pollutants such as chlorophenols [31,32] in water samples. A very recently published paper described a SPME method to analyze TCBPA in plasma samples [24], but to the best of our knowledge, a SPME extraction method has not been developed for the simultaneous analysis of brominated phenols and halogenated bisphenols in water samples.

The aim of the present study was therefore to develop a method based on SPME followed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) for the analysis of halogenated phenolic compounds, including bromophenols, TBBPA and TCBPA, in water samples. The target analytes were extracted from aqueous samples after an in situ derivatization step to obtain their corresponding acetyl derivatives. Since SPME can be affected by several experimental variables, an optimization of the SPME process was performed, and the influence of fiber coating, extraction mode and extraction temperature was evaluated using a multifactor categorical design. From the results obtained, it could be demonstrated that the selection of the optimal values for these three factors is essential to obtain high sensitivity. Linearity, precision and detection limits were evaluated in order to assess the performance of the proposed method. In addition, the feasibility of the developed method for the simultaneous determination of chlorophenols, bromophenols and halogenated bisphenols was studied, and several real water samples, including waste water, were analyzed.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and material

2-Bromophenol (2-BP, 98%), 2-bromo-4-methylphenol (2-B-4-MP, 96%), 4-bromo-3-methylphenol (4-B-3-MP, 99%), 2,4-dibromophenol (2,4-DBP, 95%), 2,4,6-tribromophenol (TBP, 99%), pentabromophenol (PBP, 96%), 3,5,3',5'-tetrachlorobisphenol A (TCBPA, 98%) and 3,5,3',5'-tetrabromobisphenol A (TBBPA, 97%) were obtained from Aldrich-Chemie (Steinheim, Germany) and 2,6-dibromophenol (2,6-DBP, >97%) from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). Phenol, *o*-cresol, *p*-cresol, 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), 2-chlorophenol (2-CP), 3-chlorophenol (3-CP), 4-chlorophenol (4-CP), 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP), 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,5-dichlorophenol (2,5-DCP), 3,5-dichlorophenol (3,5-DCP), 2,3-dichlorophenol (2,3-DCP), 3,4-dichlorophenol (3,4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), 2,3,6-trichlorophenol (2,3,6-TCP), 2,3,5-trichlorophenol (2,3,5-TCP), 2,4,5-trichlorophenol (2,4,5-TCP), 2,3,4-trichlorophenol (2,3,4-TCP), 2,3,4,6-tetrachlorophenol (2,3,4,6-TeCP) and pentachlorophenol (PCP) were supplied by Aldrich-Chemie.

Methanol, acetone and NaCl, were all purchased from Merck (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain) and  $KHCO_3$  (99.7%) from Aldrich-Chemie. All the solvents and reagents were of analytical grade. Milli-Q water was generated with a A10 laboratory water purification system from Millipore (Eschborn, Germany).

The SPME manual holders and fibers were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). In this work, five fibers were used: 85  $\mu$ m polyacrylate (PA), 100  $\mu$ m polydimethylsiloxane (PDMS), 65  $\mu$ m carbowax-divinylbenzene (CW-DVB), 75  $\mu$ m carboxen-polydimethylsiloxane (CAR-PDMS) and 65  $\mu$ m polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS–DVB). The fibers were conditioned as recommended by the manufacturer.

Individual stock solutions of each compound were prepared in methanol at a concentration of 5000  $\mu\text{g/mL}$ . A standard mixture of the target analytes was prepared at 50  $\mu\text{g/mL}$  in acetone and spiking solutions were obtained by appropriate dilutions in acetone of this standard mixture. All solutions were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Standard mixtures were discarded after 1 month and working solutions after 1 week.

Spiked water solutions were prepared by adding different volumes of acetone solution containing the target analytes or by diluting a more concentrated water sample to give the appropriate concentration level. The content of organic solvent in the sample was kept as low as possible (below 0.5%) and constant, since variations in the composition may influence the partitioning of the analytes.

Real samples, tap water, waste water and raw sewage, were used in this work. Tap water was collected from the water supply of our laboratory. Flow proportional 12 h composite waste water samples were collected in the influent and in the effluent of a waste water treatment plant (from a 125,000 inhabitants city). Raw sewage was taken in city sewers. These samples were stored in the dark at  $4^\circ\text{C}$  until being analyzed.

## 2.2. Extraction procedure

Aqueous samples of 10 mL volume were placed in headspace vials of 22 mL, where 0.3 g of potassium hydrogen carbonate and an amount of sodium chloride (from 0 to 3.5 g, depending on the experiment) were previously weighted. After that, 100  $\mu\text{L}$  acetic anhydride (derivatization reagent) were added and then, vials were sealed with a headspace aluminum cap furnished with a PTFE-faced septum and immersed in a water bath maintained at the selected extraction temperature (25, 50 or  $100^\circ\text{C}$ ). Samples were let to equilibrate for 5 min before placing the SPME device. Upon injection of the SPME syringe through the septum vial, the fiber was exposed to the headspace over the sample (HSPME) or immersed into the sample (DSPME) for 30 min (5–60 min in the kinetic study). In most experiments, the samples were magnetically stirred. After retraction of the fiber back into the syringe, the device was removed from the vial and immediately inserted into the GC injector port to carry out the chromatographic analysis. Desorption time was set at 2 min (splitless time) and desorption temperature was the maximum temperature recommended by the manufacturer:  $260^\circ\text{C}$  for CW-DVB fiber,  $280^\circ\text{C}$  for PDMS-DVB and PDMS fibers,

and  $300^\circ\text{C}$  for PA and CAR-PDMS fibers. Possible carryover was prevented by keeping the fiber in the injector for an additional time (5 min) with the injector in the split mode. Blanks were periodically run during the analysis to confirm the absence of contamination.

Waste water samples were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  pore size glass filters (Millipore, Madrid, Spain), before extraction.

## 2.3. Gas chromatography–mass spectrometry

GC–MS analysis was performed in a Varian 3800 gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) equipped with a Varian Saturn 2000 ion-trap mass detector. The system was operated by Saturn GC–MS Workstation v5.4 software. Separation of the analytes was performed in a 25 m length  $\times$  0.25 mm I.D., Varian CP-Sil8 CB Low-bleed/MS column coated with a 0.25  $\mu\text{m}$  film. The GC oven temperature program was:  $90^\circ\text{C}$  for 2 min, heated to  $300^\circ\text{C}$  at  $10^\circ\text{C/min}$  and hold for 6 min. (total analysis time, 28 min.). Helium (purity 99.999%) was employed as carrier gas, with a constant column flow of 1 mL/min. Injector was operated in the splitless mode and programmed to return to the split mode after 2 min from the beginning of a run. Injector temperature was between 260 and  $300^\circ\text{C}$  depending on the fiber used. The ion-trap mass spectrometer was operated in the electron ionization mode (70 eV). The mass range was scanned from 90 to 650  $m/z$ .

Experimental parameters for ionization were: multiplier voltage, 1800 V; filament emission current, 15  $\mu\text{A}$ ; axial modulation voltage, 4 V; ionization control, automatic mode; filament/multiplier delay, 4 min. Trap, manifold and transfer line temperatures were 250, 50 and  $300^\circ\text{C}$ , respectively.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Development of a derivatization-SPME GC–MS method

A derivatization step was introduced prior to GC analysis to improve the chromatographic properties of the compounds. Phenol acetylation with acetic anhydride in presence of hydrogen carbonate was selected and the reaction can be performed in aqueous media, in a few minutes, with high efficiency and using cheap reagents [31,33]. A detailed study of the in situ acetylation-SPME for the analysis of several phenolic pollutants

Table 1  
Retention times and selected ions for the analysis of the derivatives of the target halogenated compounds

Compound	Retention time (min)	Identification ions ( $m/z$ )	Quantification ions ( $m/z$ )
2-BP	7.15	172:174,214:216	172 + 174
2-B-4-MP	8.58	186:188,228:230	186 + 188
4-B-3-MP	9.11	186:188,228:230	186 + 188
2,6-DBP	10.03	250: 254,294:296	250 + 252 + 254
2,4-DBP	10.44	250:254,294:296	250 + 252 + 254
2,4,6-TBP	12.83	328:334,374	328 + 330 + 332 + 334
PBP	19.58	486:492,533	486 + 488 + 490
TCBPA	22.44	349:353,438:450	349 + 351 + 353
TBBPA	26.39	527:531,542:546	527 + 529 + 531

in water samples and in solids was described elsewhere [32,34]. First experiments were performed in order to check the suitability of the derivatization-SPME process for the analysis of the target compounds. In these experiments, spiked samples were extracted, after addition of sodium chloride (35%, w/v) and the reagents required for the acetylation process, during 30 min using a 100  $\mu$ m PDMS fiber.

Table 1 shows the retention times at the optimized chromatographic conditions given in Section 2, as well as the quan-

tification and confirmation ions (based on best signal-to-noise criteria) for the acetyl derivatives. The base ion clusters mass spectra were selected for quantification. In the case of derivatized bromophenols base ion clusters correspond to the loss of the acetyl group, whereas for the halogenated bisphenols, base ion clusters correspond to the loss of the acetyl groups and a methyl one. Isomeric compounds were identified by their chromatographic retention times. As can be seen in Fig. 1, an adequate resolution of the derivatives was achieved.

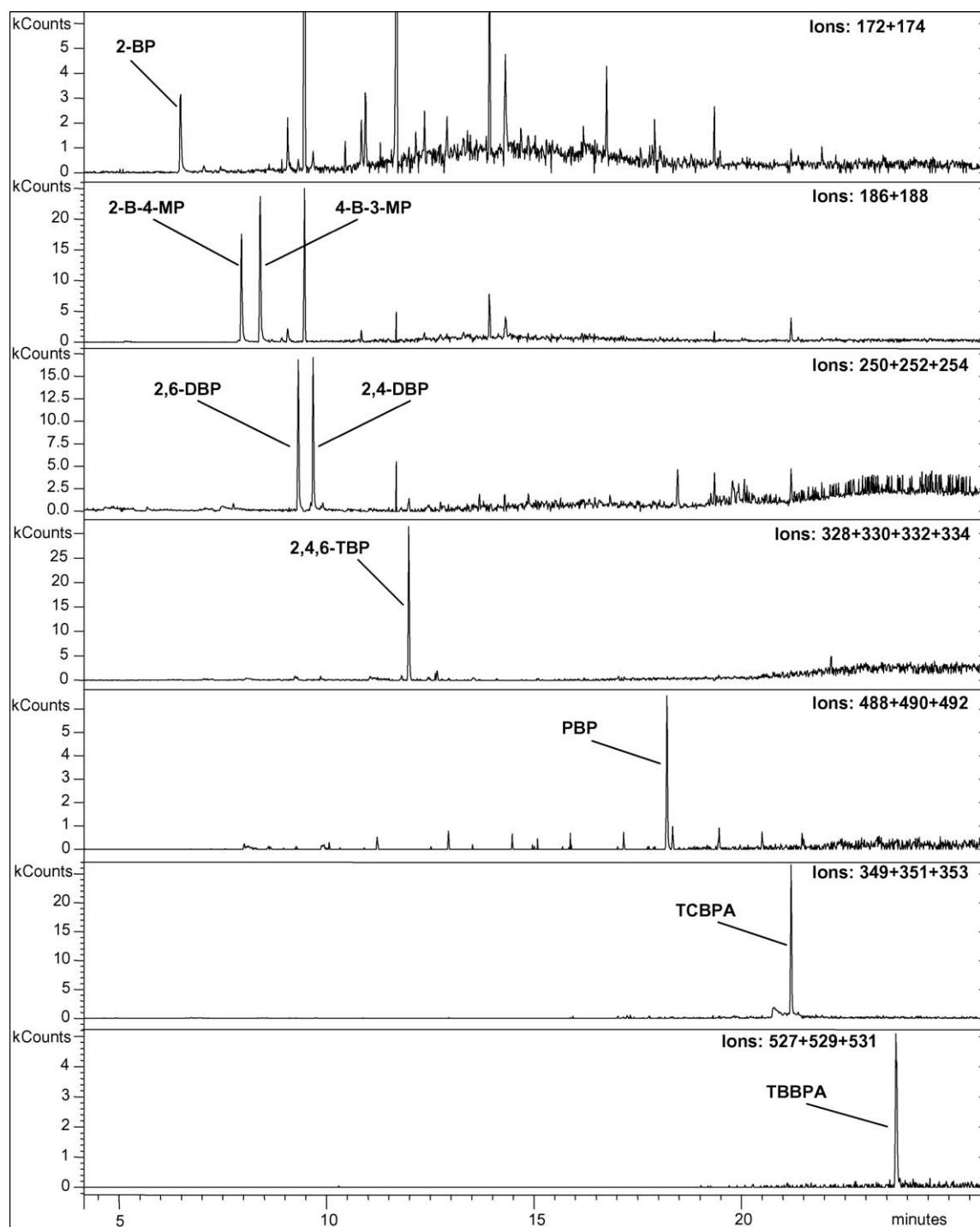


Fig. 1. Selected ion current chromatograms for an ultra-pure water sample spiked at 1 ng/mL after in situ acetylation-SPME (PDMS, HSSPME, 100 °C).

Table 2

Results of ANOVA test (*F*-ratios and *p*-values) showing the significance of main effects and interactions

Compound	Source	Main effects			Interactions		
		Fiber (A)	Temperature (B)	Extraction mode (C)	AB	AC	BC
2-BP	<i>F</i> -ratio	15.0	4.77	2.64	3.31	0.64	1.89
	<i>p</i> -value	0.00	0.04	0.14	0.06	0.65	0.21
2-B-4-MP	<i>F</i> -ratio	5.25	5.24	16.4	2.16	0.67	2.75
	<i>p</i> -value	0.02	0.04	0.01	0.15	0.63	0.12
4-B-3-MP	<i>F</i> -ratio	2.70	6.98	16.2	1.83	0.68	4.43
	<i>p</i> -value	0.11	0.02	0.00	0.20	0.62	0.05
2,6-DBP	<i>F</i> -ratio	2.85	17.3	9.52	2.29	0.51	9.17
	<i>p</i> -value	0.10	0.00	0.02	0.13	0.73	0.01
2,4-DBP	<i>F</i> -ratio	0.60	2.09	2.50	1.18	0.87	2.97
	<i>p</i> -value	0.67	0.19	0.15	0.41	0.52	0.11
2,4,6-TBP	<i>F</i> -ratio	1.57	6.27	11.2	0.95	0.80	4.49
	<i>p</i> -value	0.27	0.02	0.01	0.53	0.56	0.05
PBP	<i>F</i> -ratio	5.25	2.66	0.14	1.26	0.19	2.44
	<i>p</i> -value	0.02	0.13	0.72	0.38	0.93	0.15
TCBPA	<i>F</i> -ratio	3.27	3.66	1.07	0.55	0.14	5.93
	<i>p</i> -value	0.07	0.07	0.33	0.79	0.96	0.03
TBBPA	<i>F</i> -ratio	9.93	1.41	9.67	0.26	3.85	3.89
	<i>p</i> -value	0.00	0.30	0.01	0.96	0.04	0.07

Italicized numbers are used to denote a significant effect.

To simultaneously evaluate the main parameters affecting the microextraction process, a factorial design was run. The parameters studied in the design were: type of fiber coating (85  $\mu\text{m}$  PA, 100- $\mu\text{m}$  PDMS, 65  $\mu\text{m}$  CW-DVB, 75  $\mu\text{m}$  CAR-PDMS and 65  $\mu\text{m}$  PDMS-DVB), extraction temperature (25, 50 and 100  $^{\circ}\text{C}$ ) and extraction mode (direct SPME, DSPME, and headspace SPME, HSSPME).

A multifactor categorical 5\*3\*2 type V resolution design involving 30 runs was selected [35]. This design is a standard factorial, consisting of all combinations of the levels of the factors, which provides the advantage of being able to study main effects as well as two-factor interactions. Besides, it allows estimate the experimental error with eight degrees of freedom, which are large enough to give a certain estimation of the results.

The selection of the extraction time and other factors kept constant in the design experiments was based on several considerations. The extraction time had to be high enough to achieve good analytical sensitivity but short enough to allow high sample throughput. So, as the required chromatographic time was 28 min, an extraction time of 30 min was chosen. Since the salt addition may favor the partitioning of organic analytes from the sample to the fiber coating making them less soluble [29], sodium chloride was added to the samples (35%, w/v). In addition, magnetic stirring was used to favor mass transfer in the aqueous media. In any case, the advantage of working with NaCl sobresaturation and sample stirring will be demonstrated later.

The selected design allows to study the results using various statistic tests and graphic tools in order to determine which factors have a statistically significant effect on each compound, as well as which are the significant interactions between factors. One of them is the analysis of variance (ANOVA) which allows

identify the significant factors. Results of the ANOVA test are shown in Table 2, and for the sake of simplicity, only *F*-ratios and *p*-values are given. The *F*-ratio measures the contribution of each factor or interaction on the variance of the response. The *p*-value tests the statistical significance of each factor and interaction. When *p*-value is less than 0.05, the factor has a statistically significant effect at the 95% confidence level. As can be seen, the factor temperature (*B*) was found to be significant for all the compounds, with the exception of PBP and bisphenols. The extraction mode (*C*) was also found to be significant, as well as their interaction with temperature (*BC*) for several compounds. The factor fiber (*A*) was significant for 2-BP, 2-B-4-MP, PBP and TBBPA, and the interaction fiber-sampling mode (*AC*) was also significant for this last one. A closer look at the data must be taken to can extract the most suitable extraction conditions. One of the graphic options of the design are the interaction plots where the effect of two factors is analyzed simultaneously. Fig. 2 shows the influence of the factors type of fiber and extraction temperature on the extraction of each compound. For most of the compounds, differences between fibers at 25 and 50  $^{\circ}\text{C}$  were not as noticeable as at 100  $^{\circ}\text{C}$  and, in general, the best responses were achieved working at 100  $^{\circ}\text{C}$ . CAR-PDMS and CW-DVB were the two fibers that led to the highest responses for the less brominated compounds (2-BP, 2-B-4MP, 4-B-3-MP 2,6-DBP and 2,4-DBP) at this last temperature. In the case of TBP, all fibers except PDMS-DVB gave quite close responses at 100  $^{\circ}\text{C}$ , so, any of these fibers would be suitable for the extraction of this compound. On the other hand, PDMS provided the most efficient extraction for the highest brominated compounds, PBP and TBBPA. For TCBPA, it is interesting to notice that the CAR-PDMS and PDMS extraction



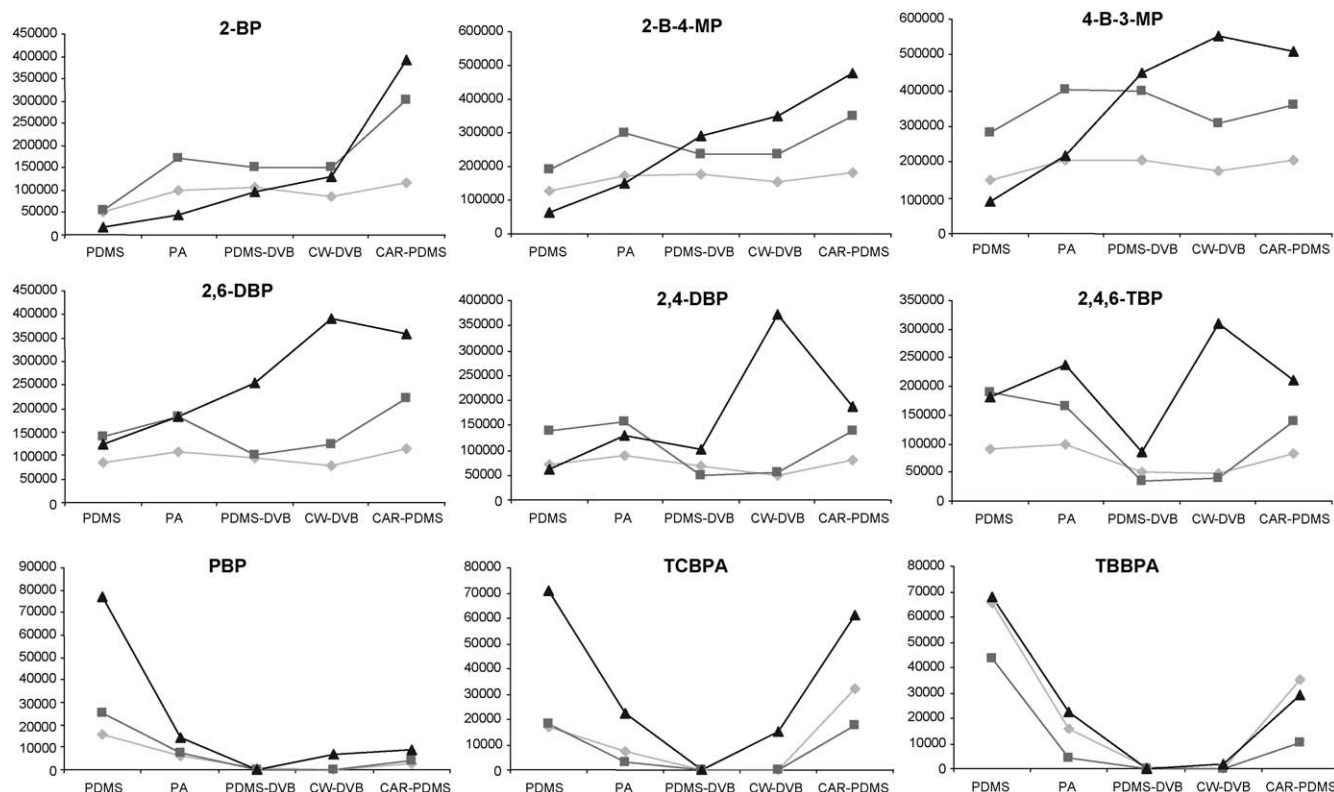


Fig. 2. Graphics showing the combined effect of factors fiber and extraction temperature (response is expressed as area counts): (◆) 25 °C, (■) 50 °C, (▲) 100 °C.

efficiencies were both the highest and the responses obtained were quite similar. The molecular weight of this compound is lower than that of PBP and TBBPA and quite similar to that of TBP, and, in general, a relation between the molecular weight of the compounds and the extraction efficiency of CAR-PDMS

appears to be observed. The outcomes may possibly be ascribed to the difference between sorption mechanisms. In the case of CAR-PDMS, adsorption on the particles surfaces dominates the extraction process whereas in the case of PDMS, absorption partitioning in the bulk of the phase is dominant [29]. Smaller

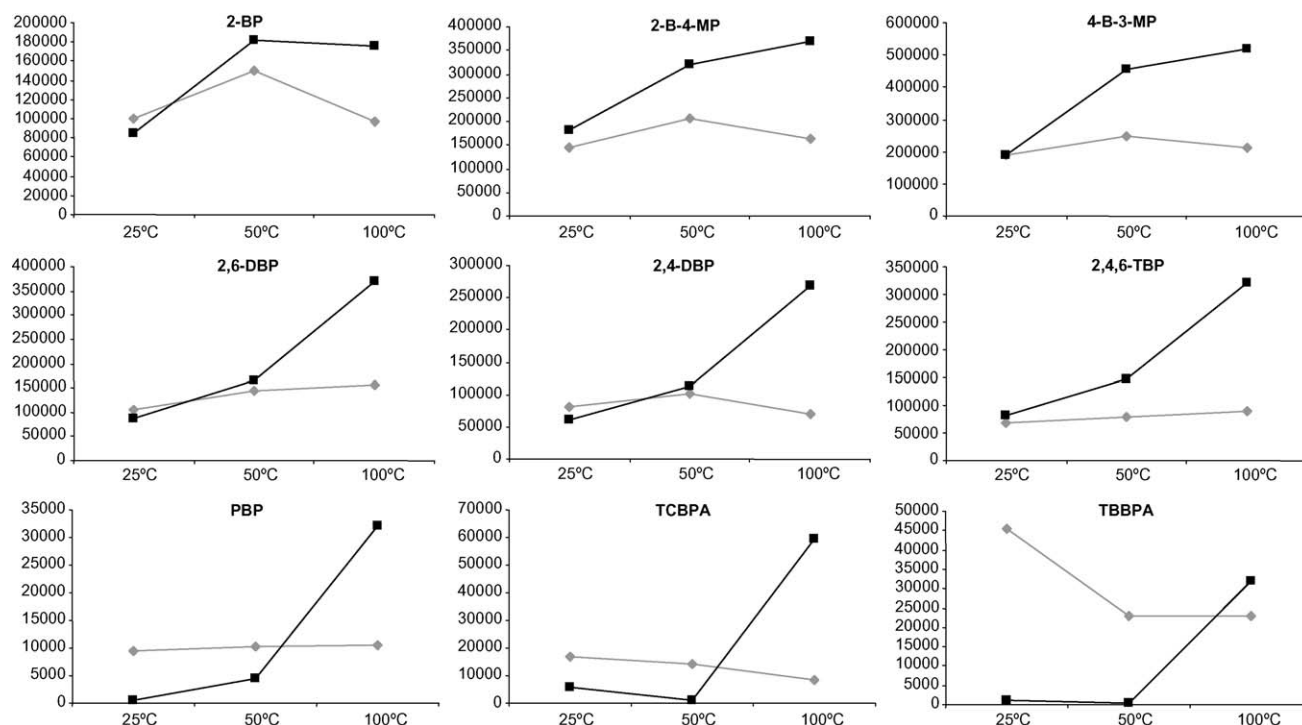


Fig. 3. Graphics showing the combined effect of factors temperature and sampling mode (response is expressed in area counts): (◆) DSPME, (■) HSSPME.

compounds can be retained into the pore of polymeric phase and bigger compounds might diffuse better into the pure phase.

Fig. 3 shows the combined effect of the factors temperature and extraction mode. Confirming ANOVA results, a significant interaction between these two factors can be observed for most compounds. In general, HSSPME was the most suitable extraction mode at high temperature and, at low temperature the extraction efficiency was better when DSPME was performed. In addition, the influence of the temperature on the efficiency of DSPME is not significant for most compounds while HSSPME responses noticeably increase with temperature, especially for PBP and TCBPA. The maximum response is achieved at these conditions (100 °C and HSSPME) for all compounds excluding TBBPA. For this compound, the best extraction conditions are DSPME at 25 °C, but when the temperature is increased to 100 °C, the DSPME efficiency decreases while HSSPME response considerably increases and, as can be seen in the figure, HSSPME response at 100 °C is only 30% lower than DSPME response at 25 °C.

The fact that the target compounds were efficiently extracted in the HS mode, it might appear unexpected considering their low vapor pressures and Henry's law constant values [13]. However, the same behavior has been observed in previous applications on SPME of other brominated compounds with low Henry's law constant values such as PBDEs [30], as well as for chlorinated compounds, such as PCBs [36,37].

Analyzing all this information, it can be seen that the optimal conditions for the extraction of each compound are quite similar. 100 °C was selected as the optimum value. According with Fig. 3, HSSPME was chosen as the most suitable extraction mode. As it was commented above HSSPME response for TBBPA at 100 °C is only 30% lower than DSPME response at 25 °C, which makes the general optimal conditions found for the other analytes also suitable for the determination of TBBPA. Comparing the results obtained for the five fibers at 100 °C (Fig. 2), it can be concluded that, in general, CAR-PDMS gave the best extraction efficiencies; so, this fiber was selected to continue the study. PDMS was also selected since it provides the highest responses for PBP and TBBPA. Finally, the fiber CW-DVB, although it gave the highest responses for some compounds, was rejected because of its very low response for PBP, TCBPA and TBBPA. Besides, this fiber showed to have a shorter lifetime and it could be used for limited number of experiments. Other authors have observed the same trouble using this fiber [38,39].

As indicated before, all the experiments of the design were carried out with salt addition. Salting out increases the ionic strength of the aqueous solution and, in this way, could decrease the solubility of organic analytes; thus, partitioning from the aqueous solution to the headspace and the fiber coating is improved [29]. To confirm the benefit of salt addition in the extraction of our compounds, samples containing different salt concentrations, from 0 to 35% (w/v), were extracted at 100 °C by HSSPME using CAR-PDMS. The increase in response with increasing salt concentration is illustrated in Fig. 4 for some representative compounds, and, so, the addition of salt is an important factor to achieve high extraction efficiency for all tar-

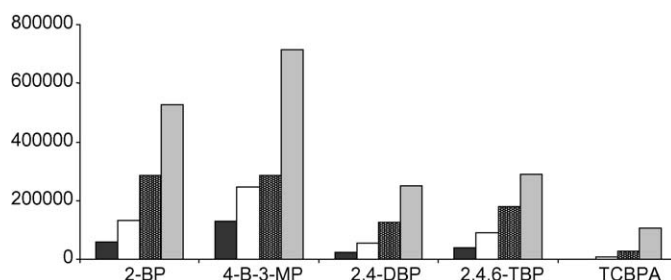


Fig. 4. Effect of the NaCl concentration (% w/v) on the extraction of some representative compounds sampling the headspace at 100 °C with CAR-PDMS fiber (response is expressed in area counts): (■) 0%, (□) 10%, (▨) 20%, (▩) 35%.

get compounds. Then, saturation of samples with 35% (w/v) of NaCl was maintained in the subsequent experiments.

Other parameter initially considered was the agitation of the sample. Speeding up the mass transfer leads to a shortness in the equilibrium times but it does not affect if the compounds are under equilibrium conditions [29]. To evaluate the effect of this factor, a set of experiments were performed with and without magnetic stirring and this factor demonstrated to be only significant for bisphenol extraction. So, in order to improve the sensitivity of the method for these two compounds, magnetic stirring was applied in all cases.

The effect of the extraction time on the response was also studied analyzing spiked water samples after 0, 5, 15, 30 and 60 min of headspace sampling using CAR-PDMS. Fig. 5 shows the extraction time profiles for some representative compounds. As can be seen, less brominated compounds (including 2,4,6-TBP) reach the equilibrium conditions in only 15 min. PBP and bisphenols did not reach equilibrium within 30 min, although they seem to be very close to this condition within 60 min of fiber exposure. In general, the increase in response from 30 to 60 min was negligible or very low and, therefore, an extraction time of 30 min was kept.

### 3.2. Performance evaluation and validation of the method

Quality parameters of the proposed method were evaluated. In order to test the linearity, calibration studies were performed using both selected fibers, CAR-PDMS and PDMS. The

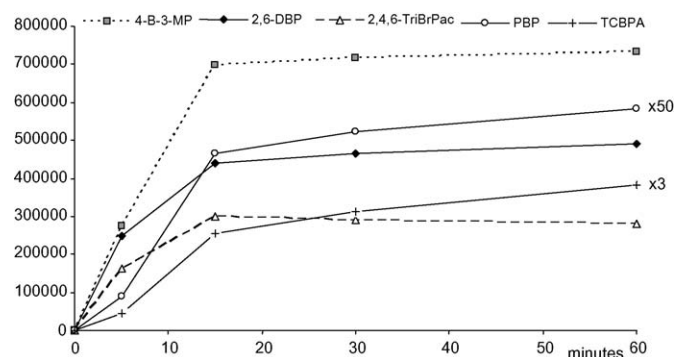


Fig. 5. Extraction time profiles for CAR-PDMS fiber (response is expressed in area counts).

Table 3  
Analytical quality parameters of the proposed method

Compound	Linearity						Limit of detection		Repeatability (RSD %, $n = 3$ )			
	Regression coefficient ( $r^2$ )		$F$ -ratio		$p$ -values		S/N = 3 (pg/mL)		0.1 ng/mL		2 ng/mL	
	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS
2-BP	0.9980	0.9967	4.66	3.74	0.12	0.09	2.1	16	4.9	3.2	6.9	4.3
2-B-4-MP	0.9978	0.9983	4.74	1.48	0.12	0.31	1.3	6.5	4.6	5.0	7.1	1.6
4-B-3-MP	0.9987	0.9988	1.93	0.83	0.30	0.54	2.2	9.2	5.8	9.5	8.2	9.5
2,6-DBP	0.9960	0.9979	6.96	3.94	0.07	0.05	2.0	8.0	6.9	6.7	7.6	6.7
2,4-DBP	0.9996	0.9990	1.23	3.16	0.43	0.10	2.2	13	2.3	0.5	5.5	7.8
2,4,6-TBP	0.9997	0.9999	6.65	0.90	0.08	0.50	1.3	2.5	6.8	2.8	2.9	5.9
PBP	0.9990	0.9994	0.18	1.80	0.70	0.23	46	12	23	5.0	19	8.4
TCBPA	0.9977	0.9990	0.01	0.09	0.93	0.96	15	12	7.5	13	8.1	11
TBBPA	0.9964	0.9972	0.02	0.03	0.98	0.99	12	12	8.4	18	7.4	10

concentration range tested was from 0.1 to 10 ng/mL for all compounds, and linear regression coefficient ( $r^2$ ) for the calibration curves are shown in Table 3. All compounds showed good correlation with both CAR-PDMS ( $r^2 \geq 0.996$ ) and PDMS fibers ( $r^2 \geq 0.997$ ). To validate the regression data, an analysis of variance (ANOVA) was performed. The lack-of-fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the experimental data obtained, or whether a more complicated model should be used. The test compares the variability of the proposed model residuals to the variability between observations (area counts) at replicate values of the independent variable (known concentration of the target compounds in the spiked Milli-Q water). Results of the lack-of-fit test for the calibration range considered, at a confidence level of 95% are also shown in Table 3. Since  $p$ -values for lack-of-fit test are greater or equal to 0.05, the linear-first-order models appear to be adequate for the experimental data.

Limits of detection (LODs) were calculated as the average amount of analyte giving a response that is three times the noise. As can be also seen in Table 3, LODs were below 15 pg/mL with CAR-PDMS fiber, except PBP (46 pg/mL), and below 16 pg/mL for PDMS, underlining the high sensitivity of the method with both fibers.

Precision of the experimental procedure was evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD) at two concentration levels, 0.1 and 2 ng/mL (see Table 3). At the lower level, the RSD values were below 10% for all the compounds using both fibers, with the exception of PBP (RSD = 23%) with CAR-PDMS, and the bisphenols with PDMS (RSD = 13% and 18% for TCBPA and TBBPA, respectively). At the higher concentration level, RSD values were very close to those found for 0.1 ng/mL with PBP showing the lowest precision using CAR-PDMS.

As SPME may be strongly influenced by sample matrix, the feasibility of the microextraction procedure must be demonstrated with real samples. In this study, the method validation was also performed with three different real water samples: tap water, effluent and influent waste water samples from an urban treatment plant. HSSPME analyses of these samples did not show initial detectable concentration of the target compounds; therefore, they were suitable for recovery experiments. Tap water and effluent waste water samples were spiked at 0.5 ng/mL concentration level, while influent waste water was spiked with 1 ng/mL, and their concentrations were evaluated by external SPME–GC–MS calibration, using MilliQ water standards. Apparent recoveries for each sample were then calculated as the ratio of the measured concentration (given by the calibration curve) to the spiked

Table 4  
Apparent recovery of the target compounds (expressed as percentage) obtained for three real-water samples

Compound	Recoveries % ( $\pm$ RSD, $n = 3$ )					
	Tap water	Effluent		Influent		Influent*
	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	PDMS
2-BP	106 $\pm$ 5	101 $\pm$ 5	102 $\pm$ 15	104 $\pm$ 15	102 $\pm$ 8	98 $\pm$ 14
2-B-4MP	104 $\pm$ 6	102 $\pm$ 5	104 $\pm$ 13	96 $\pm$ 10	100 $\pm$ 15	100 $\pm$ 23
4-B-3MP	100 $\pm$ 14	105 $\pm$ 6	103 $\pm$ 8	100 $\pm$ 13	108 $\pm$ 9	98 $\pm$ 8
2,6-DBP	99 $\pm$ 1	107 $\pm$ 8	102 $\pm$ 2	98 $\pm$ 7	106 $\pm$ 16	92 $\pm$ 14
2,4-DBP	99 $\pm$ 3	102 $\pm$ 18	108 $\pm$ 2	117 $\pm$ 4	110 $\pm$ 13	102 $\pm$ 12
2,4,6-TBP	106 $\pm$ 4	108 $\pm$ 1	111 $\pm$ 15	108 $\pm$ 4	92 $\pm$ 15	108 $\pm$ 11
PBP	91 $\pm$ 5	103 $\pm$ 7	103 $\pm$ 5	113 $\pm$ 5	108 $\pm$ 7	107 $\pm$ 8
TCBPA	96 $\pm$ 6	98 $\pm$ 1	104 $\pm$ 8	20 $\pm$ 7	17 $\pm$ 4	107 $\pm$ 11
TBBPA	101 $\pm$ 7	–	109 $\pm$ 13	13 $\pm$ 9	20 $\pm$ 5	108 $\pm$ 4

\* By standard addition calibration.



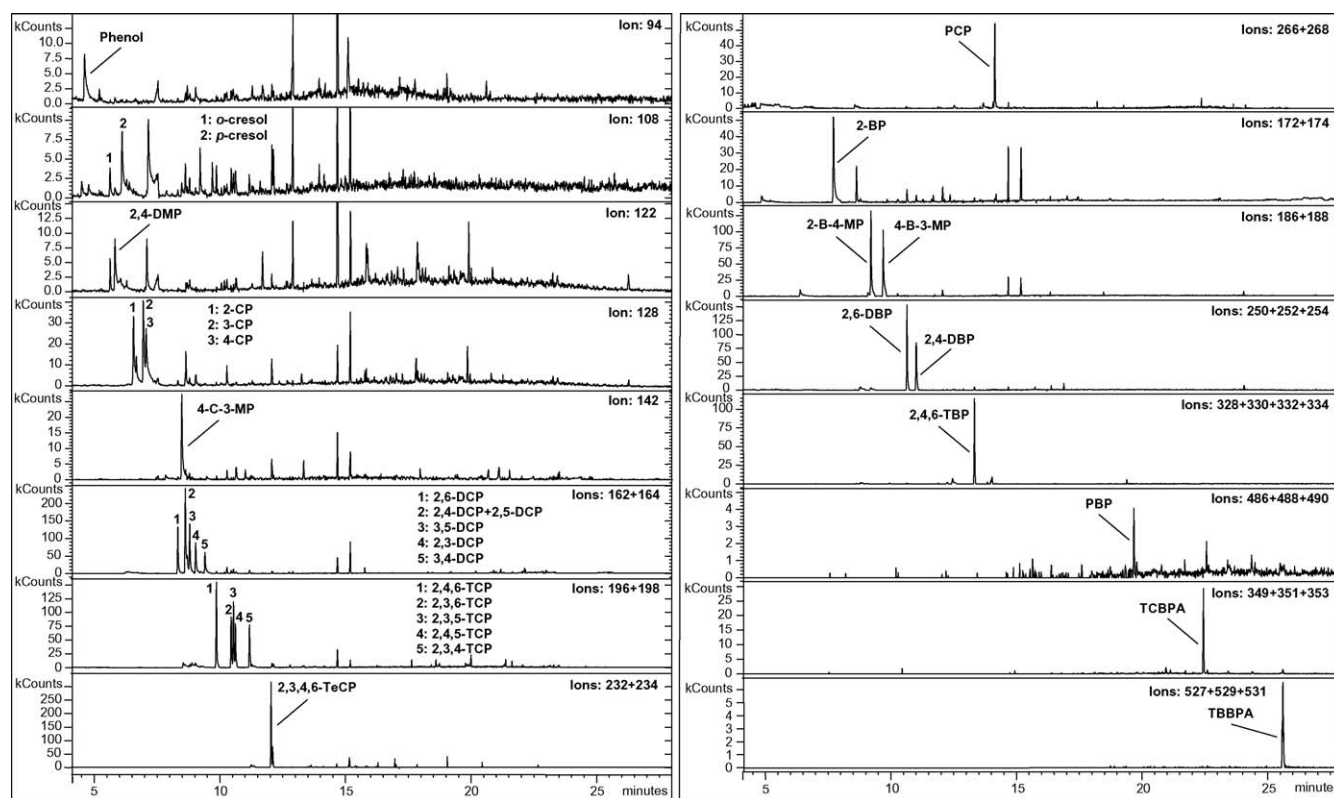


Fig. 6. Selected ion current chromatograms obtained by HSSPME with CAR-PDMS for an ultra-pure water sample spiked with 1 ng/mL of each phenol.

concentration, and expressed as percentage. Table 4 shows that recoveries for most compounds were quantitative in the three samples using both fibers. Quantification by external standard has proved to be acceptable since there is no matrix effect with the only exception of bisphenols in the influent waste water sample. It must be pointed out that this sample is the most complex one. Then, standard addition calibration was applied by spiking the sample at different concentration levels. Apparent recoveries were calculated, by the ratio of the amount of analyte found (using the standard addition calibration curve) to the amount added, and expressed as percentage. As can be seen in Table 4, recoveries were now quantitative for all compounds, including TCBPA and TBBPA. It should also be mentioned that, exclud-

ing few exceptions, the overall recoveries showed RSD below 15% even for PBP using CAR-PDMS and for bisphenols using PDMS.

In summary, the applicability of the method in different aqueous matrices has been demonstrated giving quantitative recoveries even in the case of the most complex matrix.

### 3.3. Simultaneous determination of chlorophenols and bromophenols

In a previous study regarding the analysis of chlorophenols in water samples, the extraction conditions obtained are coincident with those selected in the present study for the target phenolic

Table 5  
Analysis of several real samples using CAR-PDMS and PDMS fibers

Compound	Concentration (ng/mL)							
	Influent (n=3)		Raw sewage 1 (n=2)		Raw sewage 2 (n=2)		Raw sewage 3 (n=2)	
	CAR-PDMS	CAR-PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS	CAR-PDMS	PDMS
Phenol	0.97 ± 0.09	0.96 ± 0.09	4.3	4.9	5.9	4.7	8.5	9.0
p-Cresol	3.0 ± 0.9	3.7 ± 0.6	36	36	72	79	103	127
2-CP			0.20		0.12		0.071	
2,3-DMP	0.80 ± 0.03	0.74 ± 0.03						
4-C-3-MP			0.64	0.63				
2,6-DCP	0.013 ± 0.005	0.014 ± 0.005	0.077	0.077	0.015	0.014	0.047	0.064
2,4-DCP + 2,5-DCP	0.130 ± 0.004	0.109 ± 0.004	0.46	0.42	0.96	0.82	0.77	0.62
2,4,6-TCP	0.032 ± 0.001	0.030 ± 0.001	0.28	0.26	0.28	0.25	0.23	0.24
PCP							0.13	0.14

\* Quantification by standard addition.

flame retardants (CAR-PDMS and PDMS, HS sampling and high temperature) [32].

Therefore, the proposed method might allow the simultaneous determination of both chlorinated and brominated phenols. Fig. 6 shows the selected ion current chromatograms of a spiked water sample containing 1 ng/mL of phenol, four methylphenols and sixteen chlorophenols (including three mono-, six di- and five trichlorophenols, one tetra- and the pentachlorophenol), as well as the nine target compounds of the present study (eight bromophenols and TCBPA). Extraction was performed in the HS mode at 100 °C using CAR-PDMS. As can be seen in the figure, chlorophenols and bromophenols could be simul-

taneously analyzed. In addition, practical applicability of the general SPME method was demonstrated through the analysis of four complex water samples: influent waste water from an urban treatment plant, and raw waste water from three different city sewers. Concentration of the identified compounds was evaluated by external calibration for both CAR-PDMS and PDMS fibers. Besides, the most complex sample of all them, the influent sample, was also evaluated by the standard addition method. Results are presented in Table 5. The compounds found in the samples were phenol, *p*-cresol, 2-CP, 2,3-DMP, 4-C-3-MP, 2,6-DCP, 2,4DCP + 2,5-DCP, 2,4,5-TCP and PCP. In general, the concentrations lie in the low ng/mL level, and only phenol and

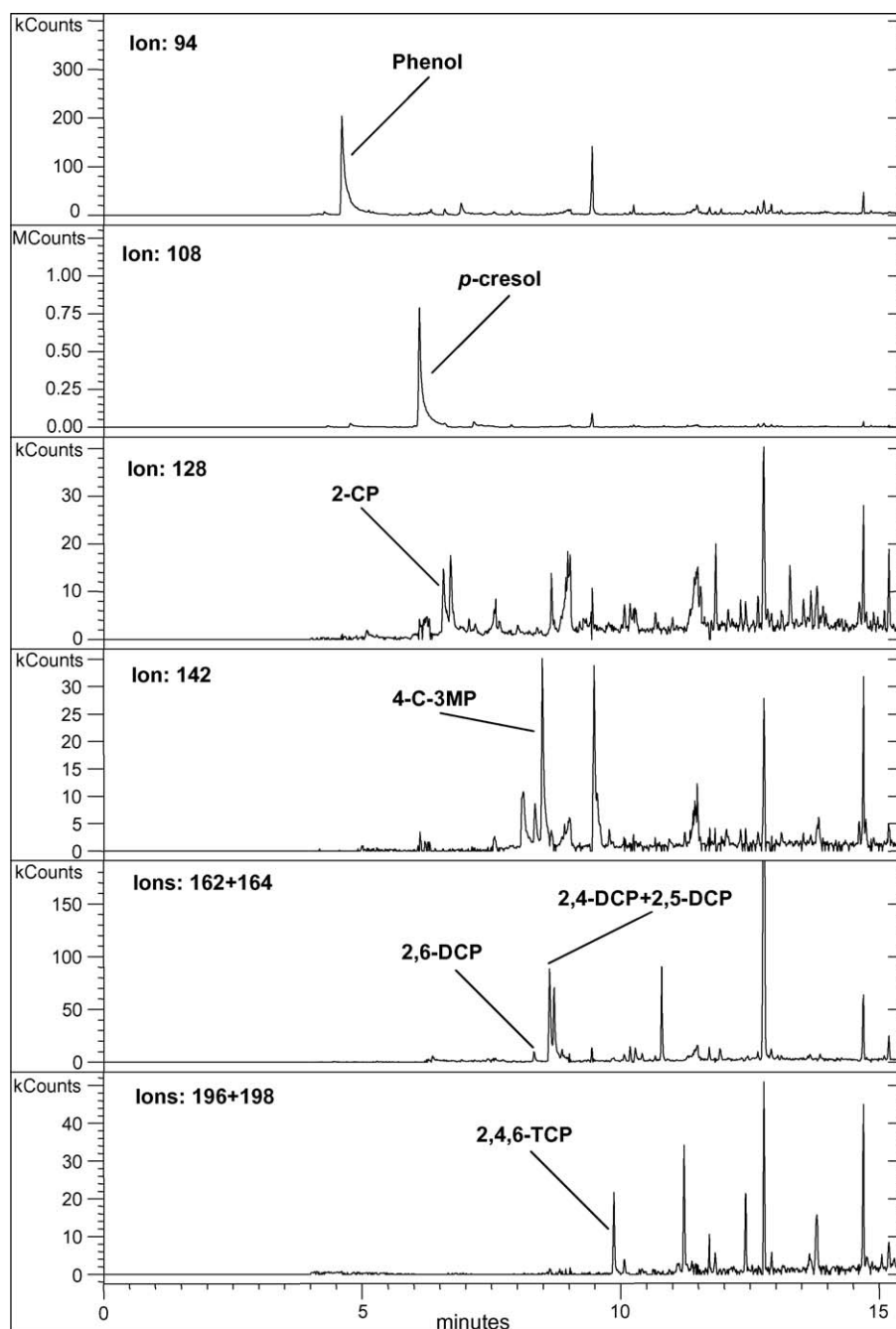


Fig. 7. Selected ion current chromatograms of a real waste water taken from a city sewer by HSSPME using CAR-PDMS.

*p*-cresol appear at higher levels (from 1 to 9 ng/mL, and from 3 to 127 ng/mL, respectively). For the influent sample, results obtained using both quantification methods were consistent and no matrix effect was observed. So, quantification by external calibration was proved again to be acceptable. It must also be pointed out that concentration values obtained by both fibers were also comparable. Fig. 7 shows the extracted ion current chromatograms for a raw water sample, in which eight phenolic compounds could be quantified, including *p*-cresol at a high concentration level.

In conclusion, the feasibility of in situ acetylation-HSSPME–GC–MS method for the simultaneous determination of brominated phenols and other phenolic pollutants in complex water samples has also been demonstrated. In general, this is the first derivatization-SPME method developed for a large number of phenolic pollutants which avoids the use of organic solvents, requires less sample manipulation and decreases the time consumption of the analysis.

## Acknowledgments

This research was supported by the projects BQU2003-02090 from CICYT, Spanish Commission for Research and Development, (Ministerio de Ciencia y Tecnología) and PGIDIT04PXIC23701PN from Xunta de Galicia. M.P. would like to acknowledge the Xunta de Galicia for her doctoral grant.

## References

- [1] R. Bloom, A. Eklund, P. Hedemalm, J. Hågsström, Brominated Flame Retardants, A Global Status Report, Orango Miljökonsulter, Gothenburg, 2000.
- [2] C.A. de Witt, Brominated Flame Retardants, Swedish Environmental Protection Agency, Report 5065, Stockholm, 2000.
- [3] A. Sjödin, H. Carlsson, K. Thuresson, S. Sjölin, A. Bergman, C. Östman, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 448.
- [4] A. Sjödin, L. Hagmar, E. Klasson-Wehler, J. Björk, Environ. Sci. Technol. 108 (2000) 1035.
- [5] C. Thomsen, H. Leknes, E. Lundanes, G. Becher, J. Chromatogr. A 923 (2001) 299.
- [6] I.A.T.M. Meerts, J.J. van Zanden, E.A.C. Luijckx, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, Toxicol. Sci. 56 (2000) 95.
- [7] M. Ghosh, I.A.T.M. Meerts, A. Cook, A. Bergman, A. Brouwer, L.N. Johnson, Acta. Cryst. D56 (2000) 1085.
- [8] Polybrominated Flame Retardants (PBRs). Priority Existing Chemical Assessment Report. No. 20. National Industrial Chemicals Notification and Assessments Scheme (NICNAS), Australian Government, Marrickville, New South Wales, June 2001.
- [9] EU Risk Assessment of TBBPA- Update. EU's Technical Committee on New and Existing Substances (TCNES), European Brominated Flame Retardant Industry Panel, Brussels, Belgium, December 2004.
- [10] T. Hyötyläinen, K. Hartonen, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 13.
- [11] M. Alae, D.B. Sergeant, M.G. Ikononov, J.M. Luross, Chemosphere 44 (2001) 1489.
- [12] J. De Boer, R.L. Colin, J.P.B. Bart, Trends Anal. Chem. 10 (2001) 591.
- [13] H. Kuramochi, K. Maeda, K. Kawamoto, Organohalogen Comp. 63 (203) 337.
- [14] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 205.
- [15] T.A. Verslycke, A.D. Vethaak, K. Arijs, C.R. Janssen, Environ. Pollut. 136 (2005) 19.
- [16] U. Sellström, B. Jansson, Chemosphere 31 (1995) 3085.
- [17] K. Öberg, K. Warman, T. Öberg, Chemosphere 48 (2002) 805.
- [18] K. Kuosmanen, T. Hyötyläinen, K. Hartonen, M.-L. Riekkola, J. Chromatogr. A 943 (2002) 113.
- [19] R. Saint-Louis, E. Pelletier, Analyst 129 (2004) 724.
- [20] J. de Boer, C. Allchin, B. Zegers, J.P. Boon, S.H. Brandsma, S. Morris, A.W. Kruijt, I. van der Veen, J.M. van Hesseligen and J.J.H. Haftka, HBCD and TBBP-A in sewage sludge, sediments and biota, including interlaboratory study, RIVO Report No. C033/02, September 2002.
- [21] C. Shaogang, G.D. Haffner, R.J. Letcher, J. Chromatogr. A 1097 (2005) 25.
- [22] J.L. Acero, P. Piriou, U. von Gunten, Water Res. 39 (2005) 2979.
- [23] T. Hayama, H. Yoshida, S. Onimaru, S. Yonekura, H. Kuroki, T. Kenichiro, H. Nohta, M. Yamaguchi, J. Chromatogr. B 809 (2004) 131.
- [24] M. del Olmo, A. Zafra, B. Suarez, A. Gonzalez-Casado, J. Taoufik, J. Vilchez, J. Chromatogr. B 817 (2005) 167.
- [25] A. Zafra, M. del Olmo, B. Suarez, E. Hontoria, A. Navalon, J.L. Vilchez, Water Res. 37 (2003) 735.
- [26] C. Thomsen, K. Janák, E. Lundanes, G. Becher, J. Chromatogr. B 750 (1) (2001) 1.
- [27] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 189.
- [28] A. Smeds, P. Saukko, Chemosphere 53 (2003) 1123.
- [29] J. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [30] M. Polo, G. Gómez-Noya, J.B. Quintana, M. Llompарт, C. García-Jares, R. Cela, Anal. Chem. 76 (2004) 1054.
- [31] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 66 (1994) 160.
- [32] M. Llompарт, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, J. Chromatogr. A 963 (2002) 137.
- [33] L. Renberg, K. Lindström, J. Chromatogr. 214 (1981) 327.
- [34] M. Llompарт, B. Blanco, R. Cela, J. Microcol. Sep. 12 (2000) 25.
- [35] Statgraphics-Plus Version 5.1, Experimental design, Appendix C, Manugistics, Rockville, MD, 2001.
- [36] M. Llompарт, K. Li, M. Fingas, Anal. Chem. 70 (1998) 2510.
- [37] P. Landín, M. Llompарт, M. Lourido, R. Cela, J. Microcol. Sep. 13 (2001) 275.
- [38] M. Möder, P. Popp, R. Eisert, J. Pawliszyn, Fresenius J. Anal. Chem. 363 (1999) 680.
- [39] F. Fernández, J. Betran, F.J. López, J.V. Gaspar, Anal. Chem. 72 (2000) 2312.

